

Identifizierung und Charakterisierung von *Kazachstania psychrophila*-
Isolaten aus vakuumverpackten Fleischproben

von Stephanie Sarah Elisabeth Vetter

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität
München

Identifizierung und Charakterisierung von *Kazachstania psychrophila*-
Isolaten aus vakuumverpackten Fleischproben

von Stephanie Sarah Elisabeth Vetter
aus München

München 2017

Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München
Lehrstuhl für Lebensmittelsicherheit

Arbeit angefertigt unter der Leitung von Univ.-Prof. Dr. Dr. habil. Manfred Gareis

Mitbetreuung durch Dr. med. vet. Rebecca Bonke

**Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Joachim Braun

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Dr. habil. Manfred Gareis

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. Mathias Ritzmann

Tag der Promotion: 11.02.2017

Meiner Familie

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ACN	Acetonitril
ATCC	American Type Culture Collection
a_w	Wasseraktivität
<i>B.</i>	<i>Bulleromyces</i>
bp	Basenpaare
BTS	Bacterial Test Standard
<i>C.</i>	<i>Candida</i>
CBA	Columbia-Schafblut-Agar
CBS	Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, Niederlande
CHCA	α -Cyano-4-Hydroxymethylsäure
<i>Cl.</i>	<i>Clostridium</i>
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
<i>Cr.</i>	<i>Cryptococcus</i>
d	Tag / Tage
<i>D.</i>	<i>Debaryomyces</i>
Da	Dalton
DNA	Desoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
DSMZ	Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig
<i>E.</i>	<i>Escherichia</i>
EWZ	Einwirkzeit
FA	Formic acid (Ameisensäure)
GYP-Agar	Glucose-Yeast extract-Peptone-Agar (Glucose-Hefeextrakt-Peptone-Agar)
h	Stunde / Stunden
Hz	Hertz
ITS	Internal-Transcribed-Spacer-Region
i.V.m.	in Verbindung mit
<i>K.</i>	<i>Kazachstania</i>
KBE	Koloniebildende Einheiten
<i>M.</i>	<i>Mrakia</i>
MALDI-TOF-	Matrix-assisted-laser-desorption/ionisation-time of flight-
MS	mass spectrometry (Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation mit Flugzeitanalysator Massenspektrometrie)
MEA	Malz-Extrakt-Agar
MEA ⁺	Malz-Extrakt-Agar plus Novobiocin
min	Minute / Minuten

MSP	Main Spectra Projection
m/z	Masse-zu-Ladung-Verhältnis
NaCl	Natriumchlorid
NCBI	National Center for Biotechnology Information
PBS	Phosphate buffered saline (Phosphat-gepufferte Salzlösung)
PCR	Polymerase chain reaction (Polymerasekettenreaktion)
pO ₂	Sauerstoff-Partialdruck
<i>Rh.</i>	<i>Rhodotorula</i>
rpm	Rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
RSD	Relative Standardabweichung
<i>S.</i>	<i>Saccharomyces</i>
S/N	Signal-to-Noise-Ratio (Verhältnis Signal-zu-Rauschen)
SAB-Agar	Sabouraud-Agar
sec	Sekunde / Sekunden
TFA	Trifluoressigsäure
THP	Thermales Hysteresis Protein
UPLC/MS	Ultra-Performance-Liquid-Chromatographie/Massen-Spektrometrie
<i>W.</i>	<i>Wickerhamomyces</i>
YGC-Agar	Yeast extract-Glucose-Chloramphenicol-Agar (Hefeextrakt-Glucose-Chloramphenicol-Agar)
YOTL	Yeast-On-Target-Lysis
μl	Mikroliter

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
2	SCHRIFTTUM.....	2
2.1	Psychrophile Hefen	2
2.1.1	Begriffsbestimmung	2
2.1.2	Einfluss der Wachstumstemperatur auf den Zellwandaufbau	4
2.1.3	Enzymaktivität psychrophiler Spezies	5
2.1.4	Vorkommen psychrophiler Hefen in der Umwelt.....	7
2.1.5	Vorkommen psychrophiler Hefen in vakuumverpacktem Fleisch	8
2.1.6	Hefebedingter Verderb von Lebensmitteln	9
2.1.6.1	Verderb induzierende Einflussfaktoren auf vakuumverpacktes Fleisch	9
2.1.6.2	Merkmale hefebedingten Fleischverderbs.....	10
2.1.7	Kazachstania psychrophila DSM 26230	12
2.2	Identifizierung lebensmittelassoziierter Hefen	15
2.2.1	Morphologische Untersuchung.....	15
2.2.1.1	Kultivierung.....	15
2.2.1.2	Koloniemorphologische Untersuchung	16
2.2.1.3	Lichtmikroskopische Untersuchung	17
2.2.2	Biochemische Untersuchung.....	21
2.2.3	Molekularbiologische Untersuchung	21
2.3	Massenspektrometrische Identifizierung lebensmittelassoziierter Hefen	23
2.3.1	MALDI-TOF-basierte Massenspektrometrie	23
2.3.2	Identifikation von Mikroorganismen mittels MALDI-TOF-MS	25
2.3.3	Präparationsmethoden	28
2.3.3.1	Proteinextraktion.....	29
2.3.3.2	Direkttransfer (Direct Smear)	30
2.3.3.3	Verkürzte Proteinextraktion	30

2.3.4	Erstellung von Referenzspektren	31
2.3.5	Einfluss der Anzuchtbedingungen auf die Zellwand von Hefen	33
3	MATERIAL UND METHODEN.....	37
3.1	Material.....	37
3.1.1	Anzahl und Herkunft der untersuchten Wildstämme.....	37
3.1.2	Herkunft der Hefe-Referenzstämme	39
3.2	Methoden	41
3.2.1	Kulturelle Verfahren.....	41
3.2.1.1	Überprüfung des temperaturabhängigen Wachstums	41
3.2.1.2	Plattenmorphologische Beurteilung.....	41
3.2.2	Lichtmikroskopische Untersuchung	42
3.2.3	Biochemische Untersuchung.....	42
3.2.4	Molekularbiologische Verfahren.....	43
3.2.4.1	DNA-Extraktion	43
3.2.4.2	Polymerasekettenreaktion (PCR)	44
3.2.4.3	Aufreinigung der PCR-Amplifikate zur Sequenzierung.....	46
3.2.5	Massenspektrometrische Identifikation psychrophiler Hefespezies.....	46
3.2.5.1	Präparationsmethoden.....	46
3.2.5.2	Messmethode	48
3.2.5.3	Nährmedieneinfluss auf die Reproduzierbarkeit der Massenspektren	49
3.2.5.4	Extraktion von <i>K. lodderae</i> CBS 2757 unter verschiedenen Bedingungen.....	51
3.2.5.5	Erstellung von Referenzspektren.....	52
3.2.5.6	Spezifitätsprüfung für das Referenzspektrum <i>K. psychrophila</i> DSM 26230	54
3.2.5.7	Vergleich der <i>Kazachstania</i> -Referenzstämme	56
3.2.5.8	Vergleich der Wildstämme aus frischen und verdorbenen Fleischproben.....	56
4	ERGEBNISSE	57
4.1	Morphologische Beurteilung	57
4.1.1	Temperaturabhängiges Wachstum.....	57
4.1.1.1	Referenzstämme.....	57

4.1.1.2 Wildstämme.....	61
4.1.2 Koloniemorphologische Untersuchung.....	62
4.1.2.1 Vergleich der Kazachstania-Referenzstämme	62
4.1.2.2 Vergleich der Wildstämme mit <i>K. psychrophila</i> DSM 26230	64
4.1.3 Lichtmikroskopische Untersuchung.....	74
4.1.3.1 Untersuchung im Nativpräparat.....	74
4.1.3.2 Färbung nach Gram	78
4.2 Biochemische Untersuchung	79
4.2.1 API 20 C AUX® und API Candida®	79
4.2.2 Zuckerreaktionstests	79
4.3 Molekularbiologische Untersuchung.....	84
4.3.1 Gelelektrophorese und Sequenzierung	84
4.3.2 Vergleich der Basensequenzen	85
4.4 Massenspektrometrische Identifizierung.....	86
4.4.1 Nährmedieneinfluss auf die Reproduzierbarkeit der Massenspektren.....	86
4.4.1.1 Nährmedieneinfluss auf <i>C. albicans</i> ATCC 10231	86
4.4.1.2 Nährmedieneinfluss auf <i>K. psychrophila</i> DSM 26230	88
4.4.2 Untersuchungen zur Messbarkeit von <i>K. lodderae</i> CBS 2757	92
4.4.2.1 Verlängerung der Inkubationszeit mit Ameisensäure (70 %).....	94
4.4.2.2 Reduktion der Kultivierungszeit	95
4.4.2.3 Reduktion der Kultivierungstemperatur	100
4.4.2.4 Zusammenfassung.....	102
4.4.3 Erstellung von Referenzspektren	103
4.4.4 Identifikation von <i>K. psychrophila</i> mittels MALDI Biotyper.....	105
4.4.4.1 Identifikation auf Basis der Proteinextraktion	105
4.4.4.2 Identifikation durch verkürzte Proteinextraktion	106
4.4.5 Spezifitätsprüfung für das <i>K. psychrophila</i> DSM 26230-Referenzspektrum.....	109
4.4.6 Massenspektrometrischer Vergleich der Kazachstania-Referenzstämme	113
4.4.7 Vergleich der psychrophilen Referenzstämme	115

4.4.8	Vergleich der Wildstämme aus frischen und aus verdorbenen Fleischproben	119
4.5	Zusammenfassung der Ergebnisse	122
5	DISKUSSION	127
5.1	Vorkommen psychrophiler Hefen in vakuumverpacktem Fleisch	127
5.2	Identifizierung von Hefen in Fleisch	129
5.3	Massenspektrometrische Charakterisierung.....	132
5.4	Verderbspotential psychrophiler Hefen	139
6	ZUSAMMENFASSUNG	141
7	SUMMARY	142
8	LITERATURVERZEICHNIS	143
9	TABELLENVERZEICHNIS	156
10	ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	159
11	ANHANG.....	165
11.1	Herkunft der Wildstämme	165
11.2	Materialien.....	166
11.2.1	Kulturelle Verfahren.....	166
11.2.2	Lichtmikroskopie	167
11.2.3	Biochemische Charakterisierung.....	167
11.2.4	Molekularbiologische Untersuchung	168
11.2.5	Massenspektrometrie	169
12	DANKSAGUNG	174

1 EINLEITUNG

Im Zuge der Globalisierung und des daraus resultierenden internationalen Fleischhandels hat sich seit den 1970er Jahren die Vakuumverpackung für frische Fleischteilstücke immer weiter durchgesetzt. Wesentliche Vorteile sind eine vereinfachte Handhabung während des Transportes über weite Strecken und die verlängerte Haltbarkeit im Vergleich zu nicht vakuumiertem Fleisch. Die geänderten Milieubedingungen führen zu einer Veränderung der mikrobiologischen Zusammensetzung, die in vakuumiertem Fleisch hauptsächlich aus psychrotoleranten fakultativ anaeroben Keimen besteht. Bei einer hohen Ausgangskeimbelastung können diese einen vorzeitigen Verderb des schlachtfrischen Fleisches verursachen, was zu hohen wirtschaftlichen Verlusten führt.

In diesem Zusammenhang spielen vor allem Clostridien und Milchsäurebakterien eine Rolle, jedoch werden immer öfter psychrophile Hefen aus vakuumverpacktem Fleisch isoliert. Über deren Eintragswege und Eigenschaften ist bis jetzt noch wenig bekannt. Unter Laborbedingungen konnte bereits ein von *Kazachstania psychrophila* ausgehendes Verderbspotential bestätigt werden. Inzwischen wurde diese Hefe auch aus verdorbenen Fleischproben isoliert.

Zum momentanen Zeitpunkt wird keine genaue Speziesbestimmung psychrophiler Hefen in der Routinediagnostik durchgeführt, weshalb das von diesen Hefen ausgehende Verderbspotential möglicherweise unterschätzt wird. Weiterhin gestaltet sich die Identifizierung von Hefen aus einer Fleischprobe bislang als sehr zeitintensiv, da hierfür umfangreiche morphologische, biochemische und molekularbiologische Untersuchungen erfolgen müssen. Eine schnellere Methode der Identifikation von Hefen bietet die MALDI-TOF-MS. Diese kommt in klinischen Laboratorien für die Diagnostik humanpathogener Bakterien und Hefen mit Erfolg zum Einsatz. Aufgrund nur geringfügig vorhandener Referenzdaten in den zur Verfügung stehenden Datenbanken der Hersteller verläuft eine Identifizierung lebensmittelassoziierter Hefen meist mit weniger Erfolg.

Ziel dieser Arbeit war es, psychrophile Hefe-Isolate des Genus *Kazachstania* aus vakuumverpacktem Fleisch durch verschiedene Verfahren zu untersuchen, um genauere Informationen über die Eigenschaften dieser noch weitgehend unbekannten Spezies zu erhalten. Durch die Erstellung von Referenzdaten für psychrophile Hefe-Isolate auf Basis der MALDI-TOF-MS wurde eine Möglichkeit der schnelleren Identifikation auf Speziesebene geschaffen.

2 SCHRIFTTUM

2.1 Psychrophile Hefen

2.1.1 Begriffsbestimmung

Hefen sind eukaryotische Einzeller und werden phylogenetisch dem Reich der Pilze zugeordnet Barnett *et al.* (2000). Innerhalb des Reiches Eumycota (echte Pilze) werden niedere und höhere Pilze unterschieden, wobei Hefen den höheren Pilzen angehören (Gedek, 2007). Anhand ihrer Fortpflanzungsform, die sowohl geschlechtlich (teleomorph), als auch ungeschlechtlich (anamorph) ablaufen kann, lassen sich Hefen den Basidiomycota und den Ascomycota zuordnen (Gedek, 2007; Hibbett *et al.*, 2007) (Abbildung 1). Es existieren einige anamorphe Stadien, die bislang keinem teleomorphen Stadium zugeordnet werden können. Diese werden zu den Deuteromycota (Fungi imperfecti) gezählt (Deák, 2008).

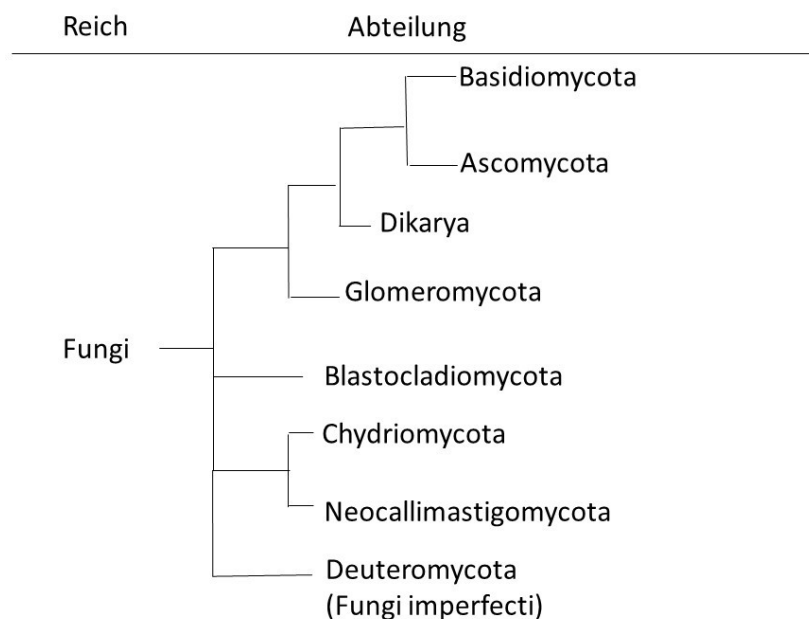


Abbildung 1: Systematische Einteilung des Reiches der Pilze nach Gedek (2007), Hibbett *et al.* (2007) und Money (2016)

Die taxonomische Zuordnung von Hefen erfolgt anhand ihrer morphologischen, physiologischen und biochemischen Eigenschaften, sowie auf molekularbiologischer Ebene (Wickerham, 1951; Kurtzman und Robnett, 1998; Barnett *et al.*, 2000; Deák, 2008).

Hefekolonien auf bestimmten Nährböden sind meist von weißer bis beiger Farbe mit cremiger, bröckeliger oder schleimiger Konsistenz. Manche Hefearten bilden Pigmente, die von orange-rötlich bis pink reichen (*Rhodotorula* spp.) (Kurtzman *et al.*, 2011) und auf die Produktion von Karotinoiden zurückzuführen sind (Mannazzu *et al.*, 2015).

Hefen nutzen als Energiequelle bevorzugt Kohlenhydrate, die sie unter aeroben Bedingungen zu Kohlendioxid (CO₂) und Wasser verstoffwechseln (Assimilation). Intrazellulär gespeichertes Glykogen dient als Energiereserve (Gedek, 2007). Abhängig vom jeweiligen Hefestamm können Unterschiede in der Assimilationsfähigkeit von Zuckern bestehen, die für die phylogentische Zuordnung herangezogen werden können (Barnett *et al.*, 2000). Unter anaeroben Bedingungen sind viele Hefen zur Fermentation von Kohlenhydraten befähigt, wobei Alkohol und CO₂ entstehen (Deák, 2004).

Der optimale a_w -Wert für das Wachstum von Hefen liegt zwischen 0,98 und 0,95 (Deák, 2008), wobei sich einige osmotolerante Hefen auch noch bei hoher Zucker- oder Salzkonzentration und einem a_w -Wert von 0,7 vermehren können (Deák, 2004). Der optimale pH-Wert für Hefen liegt im leicht sauren Bereich von 4,5 bis 5,5, jedoch zeigen Hefen eine außerordentliche pH- Wert-Toleranz und wachsen auch im Bereich von pH 3 und pH 10 (Deák, 2004).

Ein Wachstum ist für Hefen im Temperaturbereich zwischen +0 °C und +48 °C möglich (Kurtzman *et al.*, 2011). Das Temperaturoptimum befindet sich bei den meisten Hefespezies im mesophilen Temperaturbereich zwischen +20 und +30 °C (Robinson, 2001). Die Vermehrungsfähigkeit mesophiler Spezies kann jedoch auch bei geringen Umgebungstemperaturen von bis zu +4 °C erhalten bleiben, was als Psychrotoleranz bezeichnet wird (Ismail *et al.*, 2000; De Lorenzo, 2011; Kurtzman *et al.*, 2011).

Der Begriff „psychrophil“ setzt sich aus den griechischen Wörtern „psychros“ für „kalt“ und „- phil“ für „liebend“ zusammen und bedeutet demnach „kälteliebend“. Der optimale Temperaturbereich von psychrophilen Hefespezies liegt zwischen +10 und +15 °C, wobei ihre Vermehrungsfähigkeit auch bei Temperaturen um den Gefrierpunkt von Wasser erhalten bleibt (D'Amico *et al.*, 2006; Horikoshi *et al.*, 2011) (Abbildung 2). Im Vergleich zu psychrotoleranten Spezies besitzen sie bei Temperaturen von mehr als +20 °C keine Vitalität mehr (de Garcia *et al.*, 2007; Shivaji *et al.*, 2008; Dalluge und Connell, 2013; Kabisch *et al.*, 2013).

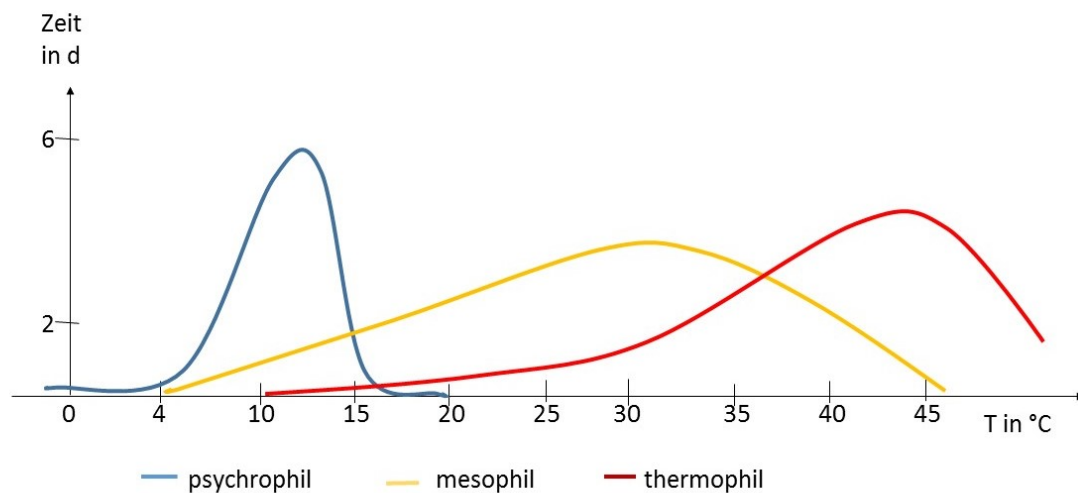


Abbildung 2: Wachstumsfähigkeit von Mikroorganismen in Abhängigkeit von der Umgebungstemperatur (nach De Lorenzo, 2011)

2.1.2 Einfluss der Wachstumstemperatur auf den Zellwandaufbau

Psychrophile eukaryotische Mikroorganismen sind Spezies, die eine außerordentliche Anpassung an extreme Umweltbedingungen durchlaufen haben (Buzzini *et al.*, 2012). Hefen, Filament bildende Pilze und Algen enthalten Sterole in ihrer Zellwand, wobei Ergosterol den größten Anteil darstellt (Russell, 2008). Dalluge und Connell (2013) untersuchten durch den Vergleich zweier psychrophiler Hefespezies (*Cryptococcus (Cr.) vishniacii* CBS 10616 und *Dioszegia cryxerica* CBS 10919) aus der Antarktis mit der mesophilen Hefe *Saccharomyces (S.) cerevisiae* die Unterschiede zwischen mesophilen und psychrophilen Spezies auf molekularer Ebene mittels Ultra-Performance-Liquid-Chromatographie/Massen-Spektrometrie (UPLC/MS). Dabei konnte bestätigt werden, dass in den Zellwänden der psychrophilen Hefen im Vergleich zur mesophilen Hefe *S. cerevisiae* signifikant höhere Gehalte an ungesättigten Fettsäuren, sowie ein höherer Gehalt an Guanosin-Diphosphat enthalten waren (Dalluge und Connell, 2013). Letzteres steht in Zusammenhang mit der G-Protein-abhängigen Signaltransduktion in das Zellinnere, sowie mit dem Purinstoffwechsel (Slessareva und Dohlman, 2006). Der höhere Gehalt ungesättigter Fettsäuren in der Zellwand, der in manchen psychrophilen Hefen 50-90 % des totalen Fettsäuregehaltes in der Zellmembran ausmachen kann (Buzzini und Margesin, 2014), erhöht deren Membranfluidität (D'Amico *et al.*, 2006; Dalluge und Connell, 2013; Buzzini und Margesin, 2014). Dies stellt einen Schutzmechanismus gegen den Einfluss kalter Temperaturen dar, die einen reduzierenden Effekt auf die Fluidität haben und so eine Funktionseinschränkung induzieren würden

(D'Amico *et al.*, 2006; Buzzini und Margesin, 2014). Sie fehlen in der Zellwand mesophiler Spezies (Dalluge und Connell, 2013).

Weitere Schutzmechanismen psychrophiler Spezies sind unter anderem die Expression von Kälteschockproteinen und Thermaler Hysteresis-Proteine (THP's). Diese wurden bereits in Zellen von Vertebraten, Wirbellosen, Pflanzen und Pilzen entdeckt und bewirken durch eine kovalente Bindung an die Oberfläche von Eiskristallen die Reduktion des Gefrierpunktes von Wasser (Barrett, 2001). Des Weiteren werden Trehalose und andere Exopolysaccharide als Kryoprotektoren diskutiert. Dabei wird Trehalose ein kolligativer Effekt zugesprochen, wodurch eine kälteinduzierte Aggregation von Proteinen vermieden werden soll (Phadtare, 2004).

2.1.3 Enzymaktivität psychrophiler Spezies

Kalte Temperaturen haben eine Reduktion der Molekularbewegung zur Folge. Bei Enzymen psychrophiler Organismen ist eine bis zu zehn Mal höhere Aktivität nachweisbar, als bei

Enzymen mesophiler Spezies (Abbildung 3) (Struvay und Feller, 2012). Hierdurch wird die von niedrigen Temperaturen induzierte Inhibition der Stoffwechselaktivität ausgeglichen (Feller und Gerday, 2003).

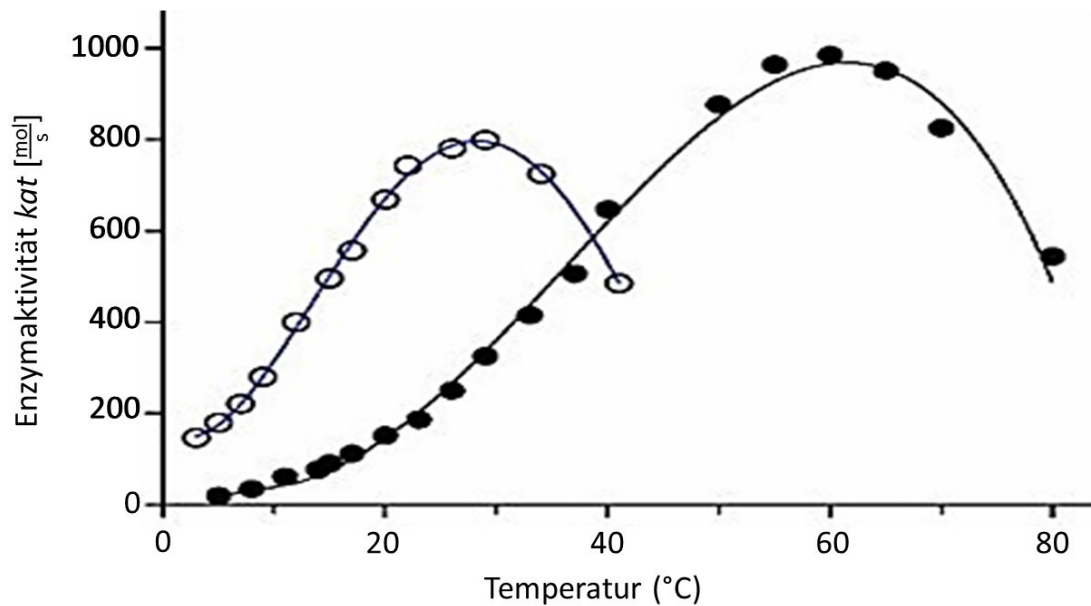


Abbildung 3: Abhängigkeit der Aktivität psychrophiler (transparente Kreise) und mesophiler (geschwärzte Kreise) Enzyme von der Temperatur (Struvay und Feller, 2012)

Die höhere Aktivität psychrophiler Enzyme steht mit einer größeren Flexibilität des Proteins in Zusammenhang, was eine erhöhte Mobilität, insbesondere im aktiven Zentrum des Proteins zur Folge hat. Diese erhöhte Flexibilität geht jedoch mit einer verminderten Stabilität einher, was eine gesteigerte Temperaturlabilität bedingt (Struvay und Feller, 2012). Mit steigender Temperatur kommt es daher noch vor der vollständigen Entfaltung des Proteins (Abbildung 4 unten) zu einer Inaktivierung des Enzyms (Abbildung 4, oben).

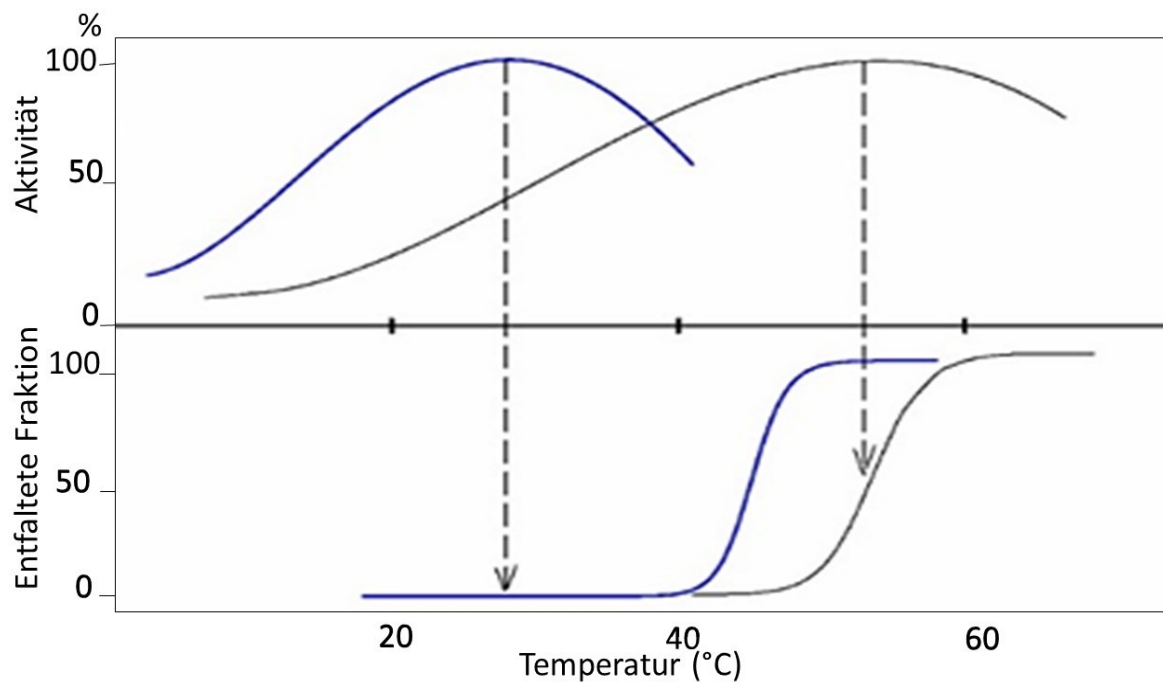


Abbildung 4: Inaktivierung (oben) und Entfaltung (unten) psychrophiler (blau) und mesophiler (schwarz) Enzyme (Struvay und Feller, 2012)

2.1.4 Vorkommen psychrophiler Hefen in der Umwelt

In über 80 % der Erdbiosphäre herrschen periodisch oder permanent kalte Temperaturen von unter +5 °C (Margesin *et al.*, 2007a; Margesin *et al.*, 2007b). Einen Großteil dieser kalten Lebensräume machen dabei die Ozeane, die Arktischen und Antarktischen Polkappen, sowie weite Gebiete mit Dauerfrostboden, wie beispielsweise die sibirische Tundra, aus. In diesen Arealen der Erde herrschen extreme Bedingungen. Nicht nur die stetig tiefen Temperaturen, sondern auch ein hoher hydrostatischer Druck, eine hohe Osmolarität, sowie niedrige Wasseraktivität (a_w -Wert) und ein Mangel an Nährstoffen erfordern eine hohe Anpassung an die in diesen Arealen der Erde vorherrschenden extremen Bedingungen (Campbell und Claridge, 2004). Trotz dieser extremen Lebensumstände gibt es prokaryotische und eukaryotische Mikroorganismen, insbesondere psychrophile Hefen, die sich optimal an die vorherrschenden Bedingungen in Gletschern oder tiefen Gewässern angepasst haben (de Garcia *et al.*, 2007; Margesin und Miteva, 2011; Buzzini *et al.*, 2012).

Zu den am häufigsten von antarktischen Böden oder aus Gletscherschmelzwasser isolierten psychrophilen Hefen gehören *Cryptococcus* (*Cr.*) spp. und Isolate der verwandten Gattung *Mrakia* (*M.*) (D'Amico *et al.*, 2006; de Garcia *et al.*, 2007; Margesin und Miteva, 2011). Auch innerhalb der Gattung *Rhodotorula* (*Rh.*) konnten beispielsweise aus alpinem Kryokonit oder

der Tauzone am Fuße eines Gletschers psychrophile Spezies isoliert werden, die eine maximale Wachstumstemperatur von +15 °C aufweisen (Margesin *et al.*, 2007a).

2.1.5 Vorkommen psychrophiler Hefen in vakuumverpacktem Fleisch

Im Zuge der zunehmenden Globalisierung und des daraus resultierenden internationalen Fleischhandels hat sich seit den 1970er Jahren die Fleischreifung im Vakuumbbeutel als eine praktikable Methode erwiesen und sich zunehmend durchgesetzt (Paniora, 2014).

Dabei wird das frische Rindfleisch nach der Abkühlung auf $\leq +7$ °C vom Knochen gelöst, portioniert und in luftundurchlässiger Folie vakuumverpackt. Die Lagerung erfolgt für zwei bis drei Wochen bei Temperaturen von -1 bis +1 °C (Lautenschläger, 2012).

Bezogen auf die natürlich vorkommende Zusammensetzung der Mikrobiota auf vakuumverpacktem Fleisch, machen Hefen nur einen kleinen, jedoch stetigen Anteil aus. Er beträgt dabei durchschnittlich 5-10 % der Gesamtmikrobiota (Kurtzman *et al.*, 2011). Dabei gehören Isolate der Gattungen *Candida* (C.), *Cryptococcus* (Cr.), *Rhodotorula* (Rh.), sowie *Debaryomyces* (D.) zu den dominierenden Hefen, die aus vakuumverpacktem Fleisch isoliert werden können (Kabisch *et al.*, 2016).

Während aus Umweltproben eine Reihe von psychrophilen Hefen isoliert werden konnten (Brizzio *et al.*, 2007; de Garcia *et al.*, 2007; Xin und Zhou, 2007; Thomas-Hall *et al.*, 2010), stehen zum aktuellen Zeitpunkt kaum Daten zum Vorkommen dieser Mikroorganismen in Lebensmitteln zur Verfügung (Tabelle 1). Es finden sich Berichte, in denen die psychrophile Hefe *M. frigida* aus Fruchtsaft isoliert und mit dessen Verderb in Verbindung gebracht wurde (Schneider *et al.*, 2006). Im Jahr 2001 konnte *M. frigida* erstmals aus gekühltem Joghurt isoliert werden (Moreira *et al.*, 2001).

Zu den psychrophilen Hefespezies, die aus gekühltem, vakuumverpacktem Fleisch isoliert wurden, zählen *Kazachstania* (K.) *psychrophila*, *M. frigida* und *M. robertii* (Kabisch *et al.*, 2010; Kabisch *et al.*, 2016). Die Spezies *K. psychrophila* wurde bisher noch nicht aus der Umwelt isoliert.

Tabelle 1: Zusammenfassende Darstellung über die Isolierung strikt psychrophiler Hefen aus Lebensmitteln

Hefespezies	Habitat	Referenz
<i>C. curiosa</i>	gefrorener Fisch aus Japan	Komagata und Nakase (1965)
<i>M. frigida</i>	gekühlter Joghurt	Moreira <i>et al.</i> (2001)
	gekühlter Fruchtsaft	Schneider <i>et al.</i> (2006)
	vakuumverpacktes Rindfleisch	Kabisch <i>et al.</i> (2016)
<i>M. gelida</i>	vakuumverpacktes Rindfleisch	Kabisch <i>et al.</i> (2010)
<i>M. robertii</i>	vakuumverpacktes Rindfleisch	Kabisch <i>et al.</i> (2010)
<i>K. psychrophila</i>	vakuumverpacktes Rindfleisch	Kabisch <i>et al.</i> (2013)
	vakuumverpacktes Lammfleisch	Paniora (2014)

C.: *Candida*; *K.*: *Kazachstania*; *M.*: *Mrakia*

2.1.6 Hefebedingter Verderb von Lebensmitteln

2.1.6.1 Verderb induzierende Einflussfaktoren auf vakuumverpacktes Fleisch

Der Verderb eines Lebensmittels ist als unerwünschte, nachteilige Beeinflussung zu sehen, die dazu führt, dass das Lebensmittel für den menschlichen Verzehr nicht geeignet ist. Nach Artikel 14 Absatz 2b i.V.m. Absatz 5 der Verordnung (EG) Nr. 178/2002 werden solche Lebensmittel als „nicht sicher“ eingestuft und sind „für den Verzehr durch den Menschen ungeeignet“.

Die sinnfälligen Veränderungen können durch intrinsische Faktoren des Lebensmittels sowie durch äußere Einflüsse, die auf ein Lebensmittel wirken, hervorgerufen werden. Intrinsische Faktoren beziehen sich auf die physikalisch-chemischen Eigenschaften eines Produkts. Zu diesen gehören die Nährstoffzusammensetzung, der pH-Wert, der verfügbare Sauerstoff, sowie die Wasseraktivität in einem Lebensmittel (Borch *et al.*, 1996; Fehlhaber, 2004).

Die äußeren Einflüsse beziehen sich auf die Lagerungs- und Umweltbedingungen eines Lebensmittels. Zu den physikalisch-chemischen Ursachen, die zum Verderb eines Lebensmittels führen können, zählen beispielsweise der Einfluss von Licht und Wärme, welcher sich nachteilig auf die Haltbarkeit eines Produktes auswirkt (Fehlhaber, 2004). Die Senkung der Lagerungstemperatur und die Schaffung eines Sauerstoff-reduzierten Milieus durch die Vakuumverpackung führt zu einer verminderten Vermehrung von Verderb induzierenden Mikroorganismen. Somit wird die Haltbarkeit verlängert (Koutsoumanis *et al.*, 2006). Dabei hat der mikrobiologische Status zum Zeitpunkt der Verpackung einen

wesentlichen Einfluss auf die Haltbarkeit (Nychas *et al.*, 2008). Verderbserreger können zum einen direkt beim Fellabzug, z.B. durch kontaminierte Hände von Mitarbeitern oder kontaminierten Messern auf das Fleisch übertragen werden (Kurtzman *et al.*, 2011). Zum anderen kann eine indirekte Kontamination des Fleisches über die Luft erfolgen (Northcutt *et al.*, 2004; Kurtzman *et al.*, 2011).

Die mikrobiologisch bedingten Stoffwechselprozesse rufen sinnfällige Veränderungen von Farbe, Konsistenz, Oberflächenbeschaffenheit, Geruch und Geschmack eines Lebensmittels hervor, wodurch die Akzeptanz der Verbraucher besonders im fortgeschrittenen Stadium des Verderbs sinkt (Fehlhaber, 2004). Jedoch ist der beginnende Verderb eines Lebensmittels oft nur schwer zu erkennen und wird daher teilweise überhaupt nicht wahrgenommen. Die Einstufung eines Lebensmittels als verdorben wird von regionalen Vorlieben und wirtschaftlichen, sowie persönlichen Voraussetzungen beeinflusst (Fehlhaber, 2004).

2.1.6.2 Merkmale hefebedingten Fleischverderbs

Beim Verderb von vakuumverpacktem Rindfleisch spielten bislang hauptsächlich fakultativ bzw. obligat anaerobe Bakterien eine entscheidende Rolle (Ercolini *et al.*, 2006). Dominierende Hefespezies, die dabei ebenso aus Fleischproben isoliert werden können, sind häufig dieselben, die auch im Schlacht- und Zerlegeprozess gefunden werden. Dazu zählen unter anderem psychrotolerante Spezies, wie *D. hansenii*, *C. zeylanoides*, *C. vini*, *Cr. curvatus*, *Trichosporon cutaneum*, *Rh. mucilaginosa* und *Yarrowia lipolytica* (Dalton *et al.*, 1984; Ismail *et al.*, 2000; Nielsen *et al.*, 2008). Hefen wurden bislang jedoch nicht zwingend mit Verderb in Verbindung gebracht (Dalton *et al.*, 1984; Kurtzman *et al.*, 2011), da sie im Gegensatz zu den meist dominierenden Milchsäurebakterien in vakuumverpacktem Fleisch (Egan, 1983; Broda *et al.*, 1996) unter gekühlten Bedingungen eine längere Generationszeit besitzen und sich daher nicht gegen die Konkurrenzmikrobiota durchsetzen können (Kabisch *et al.*, 2010).

Jedoch finden sich in der Literatur vermehrt Berichte über die Isolierung psychrophiler Hefespezies aus Lebensmitteln, die mit deren Verderb in Verbindung gebracht werden (Moreira *et al.*, 2001; Schneider *et al.*, 2006; Kabisch *et al.*, 2010; Paniora, 2014; Kabisch *et al.*, 2016).

Eine neuere Studie berichtete über die Isolierung psychrophiler Hefespezies aus vakuumverpacktem Fleisch, wie *K. psychrophila* (Kabisch *et al.*, 2013), die in Assoziation mit

dem Verderb von vakuumverpacktem Fleisch steht (Bonke *et al.*, 2016b; Kabisch *et al.*, 2016). *K. psychrophila* verursachte in einem Challenge-Versuch einen merklichen Verderb von vakuumverpacktem Rindfleisch, der sich bereits nach 16 Tagen durch die Bildung von Gasbläschen abzeichnete. Nach 40 Tagen kam es zu einer punktuellen Verfärbung des Fleischstücks. Am Ende der Versuchsreihe (84 Tage) wurde die Fleischprobe als vollständig verdorben beurteilt, sensorisch konnte ein „säuerlicher“, „fruchtiger“ Geruch festgestellt werden (Kabisch *et al.*, 2016).

Auch *Mrakia* spp., die bislang ausschließlich aus kalten Habitaten isoliert wurden und als rein psychrophil gelten, konnten inzwischen mehrmals aus vakuumverpacktem Fleisch isoliert werden (Kabisch *et al.*, 2010; Kabisch *et al.*, 2016). Ob *Mrakia* spp. einen Verderb von vakuumiertem Fleisch verursachen können, ist bislang noch nicht untersucht. Auch über die Eintragswege psychrophiler Hefen ist bisher wenig bekannt (Kabisch *et al.*, 2016).

Der hefebedingte Verderb von Fleisch ist vor allem in der Anfangsphase nicht leicht von den erwünschten Aromabildungs- und Reifungsprozessen unterscheidbar, da der Übergang oft schleichend ist (Kurtzman *et al.*, 2011). Ab Keimzahlen von 10^5 KBE/cm² ist in der Regel ein merklicher hefebedingter Fleischverderb zu verzeichnen, der sich in physikalisch-chemischen Effekten, wie Aufquellung, Schleimbildung auf der Oberfläche, Farbveränderungen sowie Geruchsabweichungen äußern kann (Dalton *et al.*, 1984).

Das Vorhandensein von buttrigen oder käsigen Gerüchen ist in der Regel bezeichnend für einen merklichen Verderb von Fleisch. Stoffwechselprodukte, wie proteolytische und lipolytische Metabolite, Kohlendioxid, Alkohole, Acetaldehyde, organische Säuren und Ester sind dabei hauptverantwortlich für die Entstehung dieser Gerüche (Dainty *et al.*, 1985). Von Hefen können sie aus Glukose fermentiert werden (Kabisch *et al.*, 2016).

Durch das von Hefen gebildete Kohlendioxid ist weiterhin ein Aufblähen der Fleischverpackung möglich (Quirós *et al.*, 2008), was eine Deformation oder auch das Bersten der Verpackung zur Folge haben kann (Fleet, 1992). Dieses Phänomen wird als „Blown Pack Spoilage“ bezeichnet, was in der Literatur jedoch hauptsächlich durch die Kontamination des Fleisches mit psychrophilen oder psychrotoleranten *Clostridium* (*Cl.*) spp., insbesondere mit *Cl. estertheticum* in Verbindung gebracht wird und bereits zwei bis vier Wochen, nachdem das frische Fleisch verpackt wurde, beobachtet werden kann (Dainty *et al.*, 1989; Broda *et al.*, 1996; Boerema *et al.*, 2003; Moschonas *et al.*, 2009).

2.1.7 *Kazachstania psychrophila* DSM 26230

Die durch Kabisch *et al.* (2013) neu beschriebene Hefespezies *K. psychrophila* wurde aus vakuumverpacktem Rindfleisch isoliert. Mittlerweile konnte sie auch aus verdorbenen Rindfleischproben bestimmt werden (Bonke *et al.*, 2016b). Die phylogenetische Zuordnung von *Kazachstania* spp. erfolgt in die Familie der *Saccharomycetaceae*, wobei das Genus *Kazachstania* zum ersten Mal im Jahr 1971 durch Zubkova mit *K. viticola* beschrieben wurde (Zubkova, 1971). Die Spezies wurde aus vergorenen Weintrauben in Kasachstan isoliert. Seither kam es zu zahlreichen Neubeschreibungen des Genus *Kazachstania* aus unterschiedlichen Habitaten, unter anderem aus Abwasser (Wu und Bai, 2005), Waldboden oder verfaulten Früchten (James *et al.*, 2015).

Das Genus *Kazachstania* wurde dem Phylum *Ascomycota* zugeordnet, da die Bildung von Ascosporen ein typisches Charakteristikum darstellt. Das lichtmikroskopische Bild ist geprägt von runden, ellipsoiden oder auch elongierten Zellen, wobei keine echten Hyphen ausgebildet werden. Pseudohyphen sind jedoch möglich. Morphologisch zeigen sich glatte, weiße bis hellbraune Kolonien auf hefespezifischen Nährmedien (Vaughan-Martini und Lachance, 2011).

Zu den physiologischen Eigenschaften gehören die Fermentation von Glucose, Sucrose und Trehalose, sowie die Assimilation von Sucrose und Raffinose. Außerdem besteht keine Fähigkeit der Nitrataassimilation. Für *Kazachstania* spp. wurde bisher noch keine Ureaseaktivität beschrieben (Kurtzman *et al.*, 2011).

K. psychrophila zeigt nach einer Inkubation über 10 Tage bei +10 °C auf Hefeextrakt-Glucose-Chloramphenicol-Agar (YGC-Agar) mit Bromphenolblau durch die Resorption des Bromphenols blaue, glatt-glänzende, buttrige Kolonien mit einer Größe von 3-4 mm und glattem Rand (Kabisch *et al.*, 2013). Lichtmikroskopisch stellt sich die Hefe durch eiförmige bis ellipsoide Zellen dar, deren Reproduktion zunächst asexuell durch unipolares oder auch multilaterales Budding erfolgt (Abbildung 5b). Analog zu anderen *Kazachstania*-Spezies (Vaughan-Martini und Lachance, 2011) können nach 28 Tagen Inkubation auf Malz-Extrakt-Agar (MEA) im Lichtmikroskop Asci mit bis zu 4 spheroidalen Ascosporen (Abbildung 5a) beobachtet werden (Kabisch *et al.*, 2013).

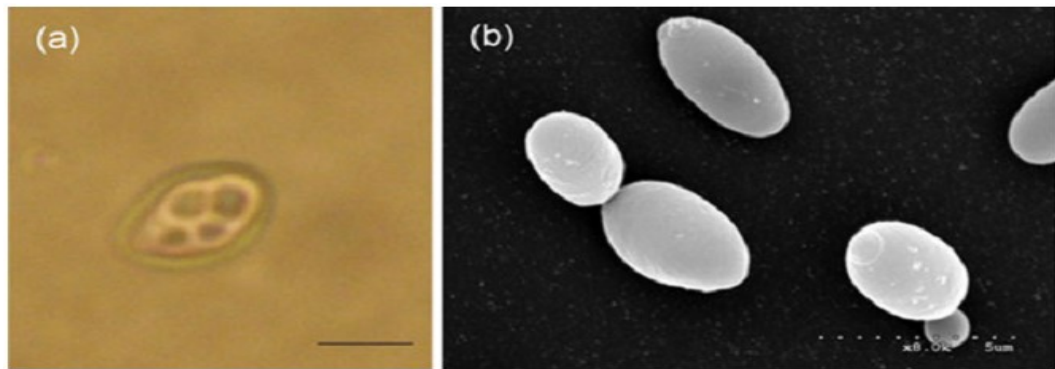


Abbildung 5: (a) Phasenkontrastmikroskopische Aufnahme nach Inkubation über 8 Tage bei +10 °C auf Malz-Extrakt-Agar (MEA), Ascus mit 4 Ascosporen (Kabisch *et al.*, 2013); (b) Elektronenmikroskopische Aufnahme von *K. psychrophila* während der Knospung nach einer Inkubationszeit von 10 Tagen bei +10 °C auf Hefeextrakt-Glucose-Chloramphenicol-Agar (YGC) (Kabisch *et al.*, 2013)

In ihren physiologischen Eigenschaften unterscheidet sich *K. psychrophila* von anderen *Kazachstania*-Spezies durch die Fermentation von Maltose (Kabisch *et al.*, 2013). Die Wachstumsfähigkeit in Medien mit einem Natriumchloridgehalt von 16 % ist im Vergleich zu anderen *Kazachstania* spp. einzigartig für *K. psychrophila* (Kabisch *et al.*, 2013), sowie das Wachstum bis zu einem Temperaturmaximum von +20 °C. Für andere *Kazachstania* spp. liegt das Temperaturoptimum bei +25 °C (Kurtzman *et al.*, 2011) (Tabelle 2).

Der Vergleich der D1/D2-Domäne der großen 26S rDNA-Untereinheit zeigt eine enge Verwandtschaftsbeziehung mit *K. lodderae* (97 % Identität), gefolgt von *K. ichnusensis* und *K. unispora* (96,1 % Identität) (Kabisch *et al.*, 2013).

Tabelle 2: Übersicht zu den physiologischen Eigenschaften von *K. psychrophila* nach Kabisch *et al.* (2013) im Vergleich zu anderen *Kazachstania* spp.

Physiologische Eigenschaften	<i>K. psychrophila</i> ¹ DSM 26230	<i>K. lodderae</i> ² CBS 2757	<i>K. unispora</i> ² CBS 398	<i>K. servazzii</i> ² CBS 4311
Fermentation				
Glucose	+	+	+	+
Sucrose	+	+	s/l	+
αα-Trehalose	+	+		-
Maltose	s/l	-	-	-
Assimilation				
Sucrose	+	+	s	s
Raffinose	+	+	-	-
Succinat	s/l	-	-	-
Osmotoleranz				
bis NaCl 10 %	+	s/l	+	+
in NaCl 16 %	s/l	- ¹	- ¹	n.u.
Temperaturbereich	+4 ≤ +20 °C	+25 < +37 °C	+25 ≤ +37 °C	+25 ≤ +37 °C

+ positiv; - negativ; s: schwach; l: langsam; n.u.: nicht untersucht; NaCl = Natriumchlorid; *K.*: *Kazachstania*;

¹: Kabisch *et al.* (2013); ²: Kurtzman *et al.* (2011)

2.2 Identifizierung lebensmittelassoziierter Hefen

2.2.1 Morphologische Untersuchung

2.2.1.1 Kultivierung

Die konventionelle Untersuchung von Hefen mit dem Ziel der taxonomischen Zuordnung stützt sich auf die Deskription der morphologischen und biochemischen Eigenschaften, sowie die Beschreibung der Zellmorphologie im Lichtmikroskop (Barnett *et al.*, 2000; Deák, 2008; Kurtzman *et al.*, 2011).

Für den Nachweis lebensmittelrelevanter Hefen kommen üblicherweise Medien wie Malz-Extrakt-Agar (MEA), Glucose-Hefeextrakt-Pepton-Agar (GYP-Agar) oder Hefeextrakt-Glucose-Chloramphenicol-Agar (YGC-Agar) zum Einsatz (Kurtzman *et al.*, 2011). Die Hauptbestandteile dieser Nährmedien sind im Allgemeinen eine Kohlenhydratquelle (z.B. Glucose), eine Stärkequelle (z.B. Kartoffelstärke) und eine Proteinquelle (z.B. Pepton) (Kurtzman *et al.*, 2011). Der pH-Wert beträgt dabei pH 4,5 bis pH 5,5 und befindet sich damit im leicht sauren Bereich (Deák, 2004). Aufgrund des hohen Glucoseanteils und des pH-Wertes kommt es zu ungünstigen Milieubedingungen für Bakterien, was zu deren Wachstumshemmung führt (Deák, 1993). Zusätzlich enthalten einige Nährmedien antibiotische Zusätze, wie beispielsweise Novobiocin oder Chloramphenicol, mit dem Ziel der Wachstumsunterdrückung für Bakterien (Bills und Foster, 2004; Stone *et al.*, 2004).

Bei der Kultivierung zum Nachweis klinisch relevanter Hefen kommen ebenso Nährmedien mit einem höheren Kohlenhydratanteil und dem Zusatz antibiotischer Substanzen (z.B. Gentamycin, Chloramphenicol) zum Einsatz (Kaben, 2005). Die Wachstumshemmung für Bakterien ist für die klinische Diagnostik aufgrund der hohen Kontaminationsgefahr von enormer Wichtigkeit, um eine Überwucherung der Hefen durch Bakterien zu vermeiden (Gray und Roberts, 1988). In der Literatur finden sich hauptsächlich Berichte über die Verwendung von Sabouraud-Agar (SAB-Agar) (Gray und Roberts, 1988; Stevenson *et al.*, 2010; Bader *et al.*, 2011; Iriart *et al.*, 2012; Villar *et al.*, 2012), der auch als Anreicherungsmedium für Hefen gilt (Kaben, 2005). Weiterhin kommen Differenzierungsnährmedien, wie beispielsweise Gorodkova-Nährboden zum Einsatz, der für die Diagnose einer cerebralen Cryptococcosis angewandt wird (Kaben, 2005).

Häufig werden Hefen und Schimmelpilze gleichzeitig ermittelt, da letztere auf den jeweiligen Nährmedien ebenfalls optimale Wachstumsbedingungen vorfinden. Da der Zusatz antifungaler Substanzen, wie beispielsweise Cyclosporin A, häufig auch zu einer Wachstumshemmung der Hefen führt, sollten diese nur bedingt zum Einsatz kommen (Kurtzman *et al.*, 2011). Zur Prävention von Schimmelpilzwachstum kann die Nährbodenplatte mit sterilem Paraffin überschichtet werden, um einen Luftabschluss zu erreichen, wobei die Methode das Wachstum von aeroben Hefe-Stämmen möglicherweise unterdrückt (Wickerham, 1951).

Die Wachstumshemmung von Schimmelpilzen kann weiterhin durch eine Inkubation von Hefen in Flüssignährmedium auf einem Schüttler erreicht werden (Wickerham, 1951). Die Ausbildung eines Pilzmycels wird durch die Bewegung im flüssigen Nährmedium unterdrückt, wodurch es nicht zu einer Überwucherung der Hefepilze kommen kann. Flüssige Nährmedien mit einem pH-Wert von pH 3,7-3,8 eignen sich zudem für die Rehabilitation von wenigen vitalen Hefezellen (Kurtzman *et al.*, 2011).

Die meisten Hefespezies sind mesophil, weshalb die Inkubation der Kulturen bei einer Temperatur von +25 °C erfolgt. Für psychrophile Spezies liegt die optimale Inkubationstemperatur zwischen +4 °C und +15 °C (Deák, 2004).

2.2.1.2 Koloniemorphologische Untersuchung

Für die morphologische Charakterisierung und vergleichende Beschreibung von Hefekulturen sollten prinzipiell folgende Charakteristika beschrieben werden (Kurtzman *et al.*, 2011):

- Farbe
- Oberfläche
- Textur
- Beschaffenheit der Ränder
- Erhebung

Abhängig vom zur Verfügung stehenden Substrat im Nährmedium kann sich das phänotypische Erscheinungsbild auf den verschiedenen Medien unterscheiden. Das farbliche Erscheinungsbild der Kolonien variiert dabei in Tönen zwischen weiß oder cremefarben bis hellbraun. Für einige Genera, wie *Rhodosporidium* oder *Kluyveromyces*, ist auch die Bildung

von farbigen Pigmenten, die in der Farbgebung von gelb, orange, rot bis pink reichen können, charakteristisch (Deák, 2004).

Die Oberflächenbeschaffenheit variiert von glänzend bis matt und kann glatt oder aufgeraut bis trocken erscheinen (Kurtzman *et al.*, 2011). Bei der Überprüfung der Textur kann zwischen schleimigem und teilweise viskösem, buttrigem oder trockenem bis bröckeligem Koloniematerial unterschieden werden. Eine schleimige Textur ist dabei oft mit der Einkapselung der Hefezellen durch die Bildung extrazellulärer Polysaccharide assoziiert (Kurtzman *et al.*, 2011).

Die Ränder der Einzelkolonien können glatt, gewellt, gelappt oder durch die Bildung von Pseudohyphen ausgefranst sein. Die Erhebung wird unter anderem als flach, konisch oder auch kuppelartig beschrieben, wobei im Zentrum beispielsweise Einkerbungen vorhanden sein können (Kurtzman *et al.*, 2011).

2.2.1.3 Lichtmikroskopische Untersuchung

Die Beschreibung der Zellmorphologie erfolgt durch die Beurteilung der Hefezellform, die Art der Reproduktion und die Anordnung der Zellen, die einzeln, in Ketten oder in Clustern vorliegen können. Für die Bestimmung der Größe der Hefezellen sollte eine Messung von Länge und Breite von mindestens 20 Zellen erfolgen (Kurtzman *et al.*, 2011).

Die Reproduktionsform von Hefen gibt Aufschluss über die Möglichkeit der familiären Zuordnung. Die Vermehrung kann asexuell (anamorph) durch Knospung (Budding) erfolgen. Auch die sexuelle (teleomorphe) Form der Vermehrung ist möglich (Wickerham, 1951; Gladfelter und Berman, 2009).

Beim Budding kommt es in der G1-Phase zur Abgrenzung der Knospungsstelle an einem Pol der Mutterzelle durch die Ausbildung eines Septinrings (=unipolares Budding) (Abbildung 6). Am Übergang zwischen G1-Phase und S-Phase (Start) kommt es zur Duplikation der Polkörperchen (gelb) und zur Sekretion geladener Vesikel, was eine Ausstülpung der Knospe (pink dargestellt) durch den Septinring bewirkt. In der S-Phase bilden sich an den Polkörperchen Mikrotubuli, im weiteren Verlauf wandern die negativ geladenen Polkörperchen an die entgegengesetzten Pole des Nukleus (G2-Metaphase). Dieser stülpt sich durch die Abstoßungskräfte der beiden Pole zum Teil in die Tochterzelle (Meta- bis Anaphase), woraufhin es letztendlich zur Abschnürung der Tochterzelle kommt (Telophase) (Gladfelter

und Berman, 2009). An der Abschnürungsstelle der Mutterzelle bleibt eine Narbe zurück. Der Vorgang der Knospung kann an einer oder mehreren Positionen der Mutterzelle stattfinden, man spricht dabei von uni- oder bipolar, bzw. multilateral, wenn sie an mehreren Positionen gleichzeitig vorkommt (Kurtzman *et al.*, 2011).

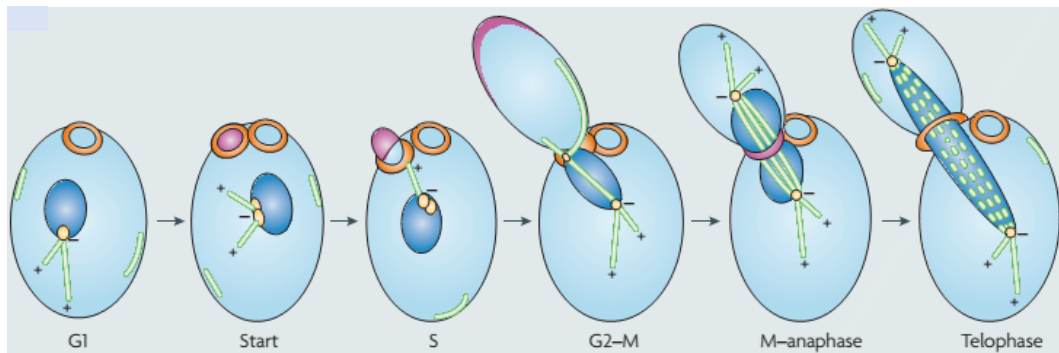


Abbildung 6: Unipolares Budding. Darstellung des mitotischen Zellzyklus am Beispiel von *S. cerevisiae* (Gladfelter und Berman, 2009)

Eine weitere Form der asexuellen Vermehrung ist die Spaltung, wie sie für *Schizosaccharomyces pombe* charakteristisch ist. Dabei erfolgt eine Duplikation der asexuellen Zelle, indem es zur Ausbildung eines Septums entlang der transversalen Achse der elongierten Hefezelle kommt. Die daraus entstandene Arthroconidie elongiert und beginnt erneut mit der Spaltung (Gladfelter und Berman, 2009; Kurtzman *et al.*, 2011).

Bei einigen Hefen kann die Ausbildung von Hyphen oder Pseudohyphen beobachtet werden. Hauptsächlich dadurch, dass Pseudohyphen durch Knospung entstehen, können sie von echten Hyphen unterschieden werden (Wickerham, 1951). Dabei verändert sich die zuvor meist runde Hefezellform zu einer filamentösen Form. Durch unipolare Knospung erfolgt die Bildung neuer Hefezellen, die jedoch nicht separieren, was zu einer Kettenbildung führt. An den Septen ist in der Regel eine deutliche Einschnürung erkennbar, was bei echten Hyphen nicht der Fall ist (Wickerham, 1951) (Abbildung 7). Weiterhin stellt sich die Hefezelle an der Spitze der Pseudohyphe kürzer dar als die vorhergehende Zelle (Abbildung 7), was ein weiteres Unterscheidungsmerkmal zu echten Hyphen darstellt (Wickerham, 1951).

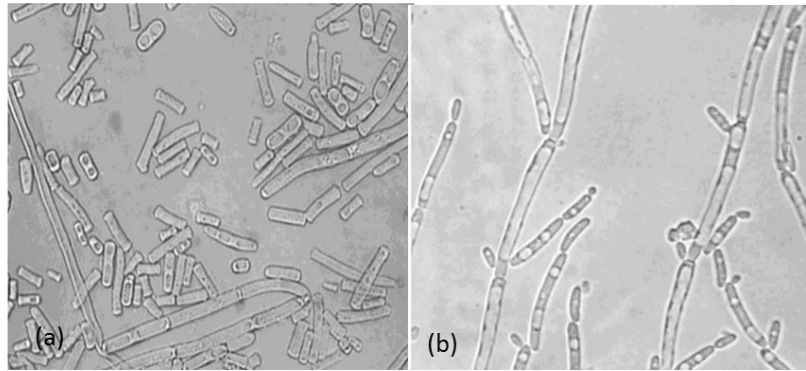


Abbildung 7: Vergleichende Darstellung (a) echter Hyphen von *Galactomyces geotrichum* (Maßstab 20 μm) und (b) Pseudohyphen von *Issatchenkia orientalis* (anamorph *C. krusei*, Maßstab 10 μm) (Deák, 2004)

Die Ausbildung von Pseudohyphen stellt eine Reaktion auf zelluläre Stressfaktoren dar (Zaragoza und Gancedo, 2000). Sie werden beispielsweise bei Substratmangel, aber auch bei Hitzestress oder starkem osmotischem Stress gebildet, weshalb funktionell von einem Überlebensmechanismus der Hefe ausgegangen wird (Zaragoza und Gancedo, 2000). Gimeno *et al.* (1993) konnten zeigen, dass Pseudohyphen als Vektor dienen. Durch das invasive Wachstum der Pseudohyphen wird es den immobilen Hefezellen möglich, entlang der Pseudohyphen zu wandern, um so den für sie schädigenden Einflüssen zu entgehen (Gimeno *et al.*, 1993).

Bei der sexuellen Fortpflanzung vermehren sich teleomorphe Stadien dagegen beispielsweise durch die Bildung einer oder mehrerer Ascosporen, die entweder innerhalb des Ascus konjugieren, um daraus als Tochterzellen hervorzugehen, oder auskeimen und dann haploide, asexuelle Zellen darstellen, die vom gegensätzlichen Paarungstyp sind (Deák, 2004). Die Konjugation der Ascosporen wird dabei durch komplementäre Glykoproteine ermöglicht, die auf der Oberfläche der unterschiedlichen Paarungstypen präsentiert werden (Crandall und Brock, 1968; Mendonca-Previato *et al.*, 1982).

Zur Ascosporulation kommt es meistens dann, wenn die äußeren Bedingungen eine asexuelle Vermehrung hemmen. Zu diesen Faktoren gehören beispielsweise ein hoher Salzgehalt im Substrat oder bestimmte Inkubationstemperaturen (Wickerham und Burton, 1954). Die Hefe *D. hansenii* sporuliert am wahrscheinlichsten bei einer Temperatur zwischen +15 und +20 °C. Innerhalb eines Stamms können beide Formen, anamorphe und teleomorphe Stadien vorliegen, die dann einer unterschiedlichen Benennung unterliegen (Deák, 2004). Unter Laborbedingungen kann die Fähigkeit zur Sporulation jedoch auch abnehmen oder vollständig

verloren gehen. Manche Stämme zeigen eine reduzierte Ascosporation bereits nach zwei bis drei Wochen, wohingegen sie bei anderen über mehrere Jahre erhalten bleibt (Kurtzman *et al.*, 2011).

Lichtmikroskopisch ist die Erscheinungsform von Ascosporen sehr variabel und kann innerhalb eines Stammes unterschiedlich ausfallen, weshalb deren phylogenetische Beschreibung nicht der Genusbestimmung dienlich ist (Kurtzman *et al.*, 2008). Sie können unter anderem als ellipsoide, walnuss- oder kugelförmige, spindelförmige oder auch nadelförmige intrazelluläre Gebilde beschrieben werden (Abbildung 8) (Kurtzman *et al.*, 2011).

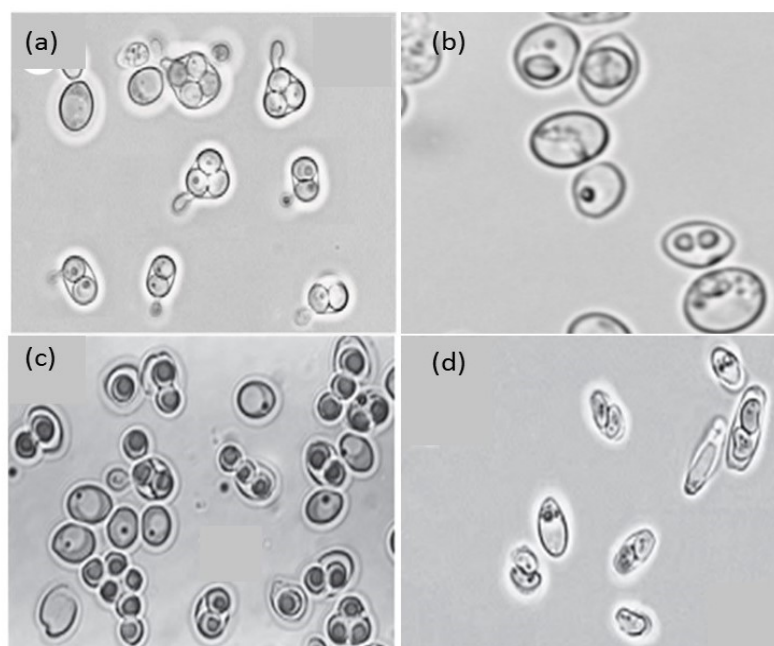


Abbildung 8: Lichtmikroskopische Aufnahmen unterschiedlicher Formen der Ascosporen; (a) persistierende Asci mit kugelförmigen Ascosporen (*Schwanniomycetes pseudopolymorphus*); (b) Ascus mit spheroidaler Ascospore (*Kazachstania pintolopesii*); (c) saturnartige Ascosporen in sich auflösenden Asci (*Saturnispora ahearnii*); (d) sich auflösende Asci mit birnenförmigen Ascosporen (*Kluyveromyces marxianus*) (Kurtzman *et al.*, 2011)

2.2.2 Biochemische Untersuchung

Eine taxonomische Unterscheidung von Hefen kann anhand ihrer biochemischen Eigenschaften vorgenommen werden. Als Kriterium wird unter anderem die Fähigkeit der Fermentation verschiedener Zucker herangezogen. Standardmäßig erfolgt dabei die Überprüfung für D-Glucose, D-Galactose, Sucrose, Maltose, Lactose, Raffinose und $\alpha\alpha$ -Trehalose in einer üblicherweise 2 % igen, für Raffinose 4 % igen Lösung. Zusätzlich kann dieser Test für D-Xylose, Stärke und Cellobiose erfolgen (Barnett *et al.*, 2000; Kurtzman *et al.*, 2011).

Weitere Kriterien für die biochemische Charakterisierung sind die Überprüfung der Assimilation verschiedener Zucker. Dies kann auf festen oder auch in flüssigen Nährmedien erfolgen. Der Test überprüft dabei die Wachstumsfähigkeit des Hefestammes auf einem Nährmedium, in dem eine spezifische Kohlenhydratkomponente als Hauptsubstrat enthalten ist (Wickerham, 1951; Deák, 1993).

Ein weiteres Testverfahren beruht auf der Assimilationsfähigkeit verschiedener Stickstoffquellen. Zu diesen gehören beispielsweise Nitrat, Nitrit, Ethylamin, Cadaverin, L-Lysin, Imidazol, Glucosamin und Kreatin. Hefen, die die Fähigkeit der Nitratassimilation besitzen, wachsen auch auf Nitrit, was jedoch umgekehrt nicht der Fall ist. Einige Stämme von *D. hansenii* wachsen zum Beispiel auf Nitrit, aber nicht auf Nitrat (Kurtzman *et al.*, 2011).

Weitere biochemische Tests sind die Überprüfung des Wachstums in vitaminfreien Medien oder der osmotischen Toleranz durch die Inokulation eines Hefestamms in konzentrierte Natriumchloridlösung. Auch die Überprüfung der Ureaseaktivität kann zur Erstellung eines biochemischen Profils herangezogen werden (Wickerham, 1951; Barnett *et al.*, 2000).

2.2.3 Molekularbiologische Untersuchung

Da konventionelle Methoden für die sichere Speziesidentifizierung von Hefen oft mehrdeutig sind, besteht in der Regel die Notwendigkeit der Untersuchung auf molekularbiologischer Ebene, da mit Hilfe dieser Methoden eine Differenzierung auf Speziesebene getroffen werden kann (Kurtzman und Robnett, 1998; Montrocher *et al.*, 1998). Insbesondere für die Identifizierung ascomycetaler Hefen eignet sich die Analyse der ribosomalen DNA der großen

(26S) Untereinheit, da die Nukleotiddivergenz in dieser Region eine Unterscheidung zwischen den einzelnen Spezies zulässt (Kurtzman und Robnett, 1998; Libkind *et al.*, 2003).

Eine weitere Möglichkeit ist die Sequenzierung der Internal-Transcribed-Spacer-Region (ITS) (White *et al.*, 1990; Leaw *et al.*, 2006). Auf Basis von ITS-Primern ist es möglich, eine Unterscheidung von Pilzstämmen auf Genusebene oder im Sinne von Populationen zu treffen (White *et al.*, 1990).

Der Abgleich der Gensequenzen kann daraufhin in öffentlich zugänglichen Datenbanken (CBS; Mycobank; NCBI) getroffen werden. Aufgrund des noch hohen Forschungsbedarfs im Bereich der Hefen kann nicht immer mit einer genauen Zuordnung der abgeglichenen Sequenz gerechnet werden. In den meisten Fällen ist jedoch eine Zuordnung auf familiärer Ebene möglich.

2.3 Massenspektrometrische Identifizierung lebensmittelassoziierter Hefen

2.3.1 MALDI-TOF-basierte Massenspektrometrie

Die MALDI-TOF-basierte Massenspektrometrie stellt eine Analysetechnik zur Bestimmung der Molekülmasse freier Ionen im Hochvakuum dar, wodurch die Identifikation von biologischen Makromolekülen erfolgen kann (Lottspeich, 2006). Karas *et al.* (1987) und Tanaka *et al.* (1988) legten den Grundstein für die Laser-Desorption/Ionisation. Mit der neu beschriebenen Methode der Matrixunterstützten Laser-Desorption/Ionisations-Massenspektrometrie (MALDI-MS) konnten erstmalig Proteine als intakte Moleküle analysiert werden. Seitdem hat sich die MALDI-TOF-MS zu einer schnellen und sicheren Identifikationsmethode von Mikroorganismen bis auf Speziesebene entwickelt (Marklein *et al.*, 2009; Bader *et al.*, 2011; Wieser *et al.*, 2012).

Diese basiert zumeist auf dem Nachweis ribosomaler Proteine und der Erstellung speziesspezifischer Fingerprint-Massenspektren im Massenbereich zwischen 2 und 20 kDa (Sauer *et al.*, 2008; Mellmann *et al.*, 2009). Die Identifikation erfolgt durch den Abgleich des Massenspektrums mit Referenzspektren, die in Datenbanken, wie z. B. Saramis (Biomérieux, Nürtingen), Andromas (Andromas, Paris) oder Biotyper OC (Bruker Daltoniks, Bremen) hinterlegt sind.

Weitere Bereiche neben der Identifikation von Mikroorganismen, in denen die Methode der MALDI-MS mittlerweile Anwendung findet, sind der Nachweis von Antibiotikaresistenzen in Bakterien (De Carolis *et al.*, 2014; Hart *et al.*, 2015) oder die Überprüfung der Authentizität von Lebensmitteln, wie beispielsweise von Fisch (Mazzeo *et al.*, 2008).

Ein MALDI-TOF-Massenspektrometer besteht aus einer Ionenquelle, in der aus einer Probe mittels Laserenergie Moleküle in gasförmige Ionen überführt werden, einem unter Hochvakuum stehenden Flugrohr (TOF), in dem die Ionen sich in Abhängigkeit von ihrer Masse in unterschiedlichen Geschwindigkeiten bewegen, und einem Detektor zur Messung des Ionenstroms, wodurch sich eine Äquivalenz der Flugzeit eines Ions zu dessen Masse ergibt (Lottspeich, 2006) (Abbildung 9). Innerhalb des Flugzeitanalysators (Time of Flight) besteht ein Vakuum. In diesem erfolgt eine genaue Messung der Flugzeit der ionisierten Proteine, die in der Beschleunigungsstrecke der Quelle durch ihr unterschiedliches Masse-zu-Ladungs-Verhältnis (m/z) bei gleicher kinetischer Energie auf verschiedene Geschwindigkeiten

gebracht wurden. Da das Verhältnis von Masse zu Ladung dem Quadrat der Flugzeit proportional ist, lässt sich die jeweilige Masse aus der gemessenen Flugzeit ermitteln (Lottspeich, 2006).

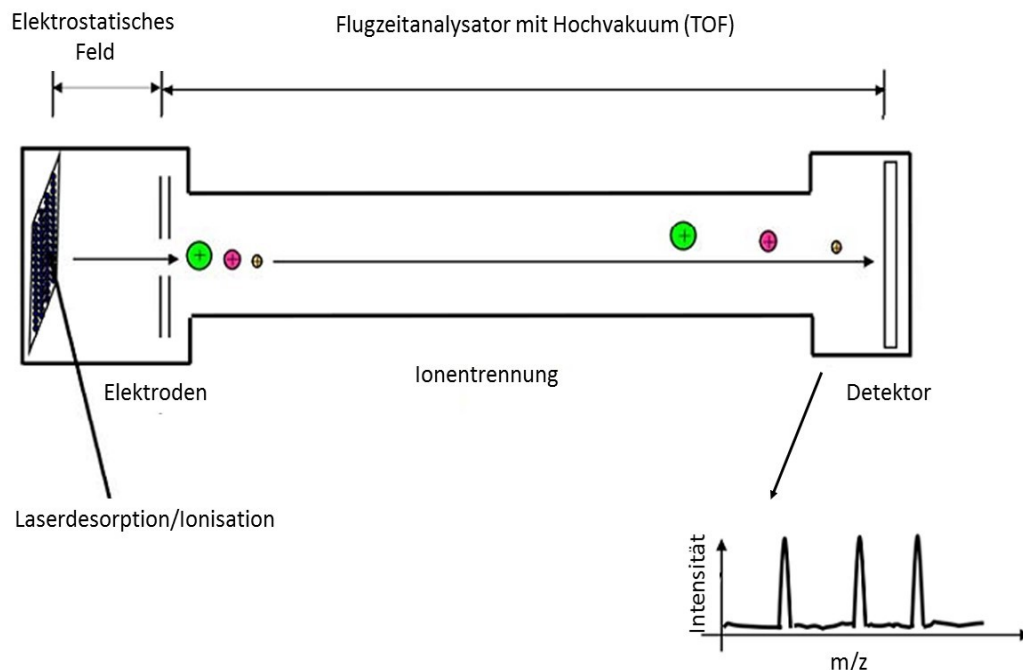


Abbildung 9: Schematische Darstellung eines MALDI-TOF-MS (nach Lottspeich (2006)). TOF: Time of Flight; m/z: Masse-zu-Ladungs-Verhältnis

Die Ionisierung der Analytmoleküle kann entweder durch Aufnahme oder Abgabe eines Elektrons erfolgen, was bei der Laser-Desorptions-/Ionisationsmethode durch den Beschuss mit Photonen erreicht wird (Caprioli *et al.*, 1997; Lottspeich, 2006). Der Laserbeschuss kann entweder mit einem Stickstofflaser mit einer Wellenlänge von 337 nm und einer Impulsdauer von 3 – 5 ns oder mittels eines Impulsfestkörperlaser mit einer Wellenlänge von 355 bzw. 266 nm und einer Impulsdauer von 5 – 15 ns erfolgen. Durch das elektrostatische Feld von einigen 100 bis einigen 1000 V mm⁻¹, das durch eine anliegende Elektrode erzeugt wird, kommt es zum Protonenübergang und zur Beschleunigung des Analyten (Lottspeich, 2006; Wieser *et al.*, 2012).

Ohne die Einbettung des Analyten in das Kristallgitter der Matrix würde es durch den Laserbeschuss zu einer Fragmentierung der Probenmoleküle kommen, weshalb diese Einbettung als Voraussetzung für das Funktionieren der Laser-Desorption/Ionisation angesehen wird (Hillenkamp und Karas, 2000; Schubert und Wieser, 2011; Clark *et al.*, 2013).

Die Anwendung von Matrices, wie α -Cyano-4-Hydroxymethylsäure (CHCA) für Peptide oder 2,5-Dihydroxybenzoesäure für Proteine (Lottspeich, 2006), hat sich insbesondere für die Routinediagnostik von Mikroorganismen bewährt (Marklein *et al.*, 2009; Stevenson *et al.*, 2010; Iriart *et al.*, 2012). Aus der Summe der durch den Detektor gemessenen Daten wird das Massenspektrum generiert, welches vergleichbar mit einem individuellen Fingerabdruck für eine bestimmte Spezies mit Massen im Bereich zwischen 2 und 20 kDa ist (Wieser *et al.*, 2012).

2.3.2 Identifikation von Mikroorganismen mittels MALDI-TOF-MS

Durch eine Vielzahl an Referenzdaten in den entsprechenden Datenbanken können durch die MALDI-TOF-MS die meisten klinisch relevanten Bakterien, Hefen und Pilze identifiziert werden. Dies ermöglicht einen frühzeitigen und gezielten Therapiebeginn für erkrankte Patienten. Insbesondere in der antifungalen Therapie stellt dies einen Vorteil dar, da Patienten mit systemischen Pilzinfektionen oft immunsupprimiert sind und daher besonders von einem frühzeitigen Therapiebeginn profitieren (Marklein *et al.*, 2009; Bader *et al.*, 2011; Santos *et al.*, 2011).

Die Identifikation von Mikroorganismen erfolgt durch den automatischen Abgleich des erzeugten Spektrums der entsprechenden Software mit Referenzspektren nach einem Algorithmus. Diese Referenzspektren (Main Spectra Projection, MSP) können sich aus mehreren Einzelspektren eines Isolats (Biotyper OC, Bruker Daltoniks) oder auch aus sogenannten Superspektren, bestehend aus mehreren Spektren verschiedener Isolate (Saramis, Biomérieux), zusammensetzen.

Die Software Biotyper OC (Bruker Daltoniks) ermittelt einen Summenwert (Score Value) im Bereich von 0,000 bis 3,000, der sich aus den errechneten Übereinstimmungen des Analyten mit den hinterlegten Referenzdaten ergibt. Dazu zählen drei Charakteristika. Zum einen wird die Zahl der Massenpeaks des Probenspektrums mit der Zahl der Peaks im Referenzspektrum abgeglichen. Daraufhin wird die Zahl der Probenpeaks ermittelt, die denen im Referenzspektrum sehr ähnlich sind, woraufhin die Ähnlichkeit der Peaks mit hohen Intensitäten überprüft wird (Anonymous, 2012). Daraus ergeben sich drei Werte, die miteinander multipliziert werden und aus denen sich der Score Value als dekadischer Logarithmus errechnet (Tabelle 3). Dieser kann maximal 3 (= $\log 1000$) erreichen (Anonymous, 2012).

Tabelle 3: Bedeutung der ermittelten Summenwerte durch die Software Biotyper OC (Bruker Daltoniks) nach Anonymous (2012)

Score Value	Bedeutung
3,000 – 2,300	hochwahrscheinliche Identifikation auf Speziesebene
2,299 – 2,000	Identifikation der Gattung mit möglicher Identifikation auf Speziesebene
1,999 – 1,700	eventuelle Identifikation der Gattung
≤ 1,699	keine sichere Identifikation des Organismus

Der Fokus der Herstellerdatenbanken liegt insbesondere auf der Identifizierung klinisch relevanter Bakterien und Hefen. Beispielsweise enthält die Datenbank von Bruker Daltoniks derzeit über 6000 unterschiedliche Referenzdaten für die Diagnostik von Mikroorganismen, von denen 71 Referenzspektren für Hefen darstellen (Anonymous, 2015). Derzeit werden die Referenzdaten auch für Mikroorganismen aus dem lebensmittelhygienischen Bereich ergänzt, jedoch liegt auch hier der Fokus vorwiegend auf den Daten für pathogene Organismen (Giebel *et al.*, 2010). Zu diesen zählen vor allem *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp. oder *Listeria* spp., die in Assoziation mit Lebensmittelinfektionen und -intoxikationen stehen (Bessède *et al.*, 2011; Dieckmann und Malorny, 2011; Jadhav *et al.*, 2015).

Für Verderb induzierende Hefen stehen bislang kaum massenspektrometrische Daten zur Verfügung, weshalb viele Isolate aus Lebensmitteln nur unzureichend mit der entsprechenden Software identifiziert werden können (Tabelle 4) (Pavlovic *et al.*, 2014). In der Literatur, die sich vor allem mit humanpathogenen Stämmen und deren Identifikation durch die MALDI-TOF-MS beschäftigt (Tabelle 4), finden sich aktuell nur zwei Autoren, die sich mit der MALDI-TOF-MS-basierten Identifikation von verderbassozierten Hefespezies beschäftigt haben (Tabelle 4). Dabei befasste sich die Arbeitsgruppe um Usbeck *et al.* (2013) mit der Optimierung der Präparationsmethoden und dem Einfluss der Anzuchtbedingungen auf die Reproduzierbarkeit der Massenspektren der verderbsassozierten Hefen *S. cerevisiae*, *D. hansenii* und *Wickerhamomyces (W.) anomalus* (s. Kapitel 2.3.5).

Pavlovic *et al.* (2014) beschäftigten sich dagegen mit der Fragestellung, inwieweit verderbsassozierte Hefen aus Lebensmitteln mit Hilfe der MALDI-TOF-MS identifizierbar sind und verglichen die massenspektrometrische Methode mit klassischen Verfahren (Tabelle 4). Dabei konnten von insgesamt 96 Hefe-Isolaten aus verschiedenen Lebensmitteln 63 Isolate

auf Speziesebene (Score Value > 2,000) richtig identifiziert werden. Während 16 Isolate gar nicht identifiziert werden konnten, wurden 17 Isolate lediglich auf Genusebene erkannt. Von den 16 nicht identifizierten Isolaten, die zehn verschiedenen Spezies angehörten, war für sieben der Isolate (*K. africana* und *Rhodospordium* spp.) kein MSP hinterlegt. Fünf der 16 Isolate konnten weder mit konventionellen Methoden noch mit MALDI-TOF-MS identifiziert werden. Drei Isolate konnten gar nicht identifiziert werden, obwohl andere Isolate derselben Spezies mit einem Score Value von > 2,000 identifiziert werden konnten (Pavlovic *et al.*, 2014).

Zur massenspektrometrischen Untersuchung psychrophiler Hefe-Isolate aus Lebensmitteln finden sich zum jetzigen Zeitpunkt keine Daten. Aus genannten Gründen liegt der Goldstandard zur Identifizierung von aus Lebensmitteln isolierten Hefen zu einem großen Teil immer noch in der Sequenzierung des 26S rDNA-Genabschnitts der großen Untereinheit bzw. der Internal Transcribed Spacer Region (ITS) in Kombination mit der Untersuchung der physiologischen und morphologischen Eigenschaften (Pavlovic *et al.*, 2014).

Tabelle 4: Literaturübersicht zu Untersuchungen humanpathogener und lebensmittelassoziierter Hefen mittels MALDI-TOF-MS

Fachbereich	Fragestellung	Referenz
Humanmedizin (Literaturauswahl)	Optimierung der Präparationsmethodik und Untersuchungen der Anzuchtbedingungen mit Auswirkungen auf die Massen	Qian <i>et al.</i> (2008)
	Identifikation klinischer Isolate	Marklein <i>et al.</i> (2009)
	Identifikation klinischer Isolate	Stevenson <i>et al.</i> (2010)
	Vergleich der Identifikation klinischer Isolate durch klassische Verfahren und MALDI-TOF-MS	van Veen <i>et al.</i> (2010)
	Untersuchungen zur Verlässlichkeit der Identifikation klinischer Isolate mit MALDI-TOF-MS	Pinto <i>et al.</i> (2011)
	Vergleich verschiedener Präparationsmethoden	Cassagne <i>et al.</i> (2011)
	Identifikation klinischer Schimmelpilz- und Hefeisolate	Iriart <i>et al.</i> (2012)
	Untersuchungen zur Präparationsmethodik	Goyer <i>et al.</i> (2012)
	Identifikation klinischer Schimmelpilz- und Hefeisolate	Bader (2013)
	Präparationsmethoden	Clark <i>et al.</i> (2013)
Lebensmittelhygiene	Identifikation klinischer Isolate durch Direkttransfer	Gorton <i>et al.</i> (2014)
	Optimierung der Präparationsmethodik Identifikation mittels MALDI-TOF-MS	Usbeck <i>et al.</i> (2013) Pavlovic <i>et al.</i> (2014)

2.3.3 Präparationsmethoden

Für die MALDI-TOF-MS-basierte Identifizierung klinisch relevanter Hefen wurden einige verschiedene Probenaufbereitungsverfahren getestet, die in den folgenden Kapiteln näher beschrieben werden (Tabelle 5).

Tabelle 5: Übersicht über bisher beschriebene Präparationsmethoden zur massenspektrometrischen Messung von Hefen und Schimmelpilzen

Präparationsmethode	Referenzen
Direkttransfer	Vlek <i>et al.</i> (2014)
verkürzte Proteinextraktion mit 1 µl Ameisensäure (70 %) mit 1 µl Ethanol (100 %)	Bille <i>et al.</i> (2012), De Carolis <i>et al.</i> (2012)
Proteinextraktion mit Ethanol (100 %) und FA (70 %)	Anonymous (2014), Stevenson <i>et al.</i> (2010), Cassagne <i>et al.</i> (2013)
erweiterte Proteinextraktion	
Proteinextraktion mit physikalischer Vorbehandlung:	
Behandlung mit Glasperlen	Amiri-Eiasi und Fenselau (2001), Fagerquist <i>et al.</i> (2005), Hettick <i>et al.</i> (2008), Cassagne <i>et al.</i> (2011)
Thermische Vorbehandlung	Vargha <i>et al.</i> (2006)
Ultraschallbehandlung	Easterling <i>et al.</i> (1998)

FA: Ameisensäure (Formic Acid)

2.3.3.1 Proteinextraktion

Zum Zweck der Aufreinigung des Koloniematerials geht der Proteinextraktion mit Ethanol (100 %) und Ameisensäure (70 %) ein Waschschriff mit 300 µl Wasser und 900 µl reinstem Ethanol voraus (Anonymous, 2014). Durch das Hinzufügen von reinstem Ethanol kommt es zur Abspaltung der Hydroxyl-Gruppen (OH-Gruppen) von zelleigenen, lytischen Enzymen, wie Proteasen und Lipasen, die eine inhibierende Wirkung auf den Ionisationsvorgang haben können, und somit zu deren Inaktivierung (Bader, 2013). Nach dem Zentrifugieren wird der Überstand abpipettiert und das Pellet einige Minuten der Lufttrocknung unterzogen, wonach es mit Ameisensäure (70 %) und Acetonitril aufgeschlossen wird (Stevenson *et al.*, 2010; Bader *et al.*, 2011; Dhiman *et al.*, 2011; Chen *et al.*, 2013).

Eine erweiterte Methode der Extraktion stellt die Inkubation mit Ameisensäure (70 %) über 5 Minuten dar, was eine bessere Lyse stabiler Zellwände bewirkt (Cassagne *et al.*, 2011). Nach der Trennung des Extraktes in Pellet und Überstand durch einen weiteren Zentrifugationsschritt wird jeweils 1 µl des Extraktes auf eine Targetplatte pipettiert und mit 1 µl Matrix überschichtet.

Durch die Proteinextraktion mit Ethanol (100 %) und Ameisensäure (70 %) können qualitativ hochwertige Spektren mit hohem S/N-Verhältnis (Signal-to-Noise-Ratio) erzielt werden, wodurch eine höhere Anzahl spezifischer Massen in einem Spektrum erzeugt werden kann, als bei anderen Präparationsverfahren (Bader, 2013).

2.3.3.2 Direkttransfer (Direct Smear)

Für viele Bakterienarten ist der direkte Transfer vom Nährboden auf die Targetplatte eine einfache und schnelle Möglichkeit der Identifikation. Dabei wird eine sehr kleine Bakterienmenge (10^4 bis 10^6 KBE) direkt auf eine Targetplatte aufgetragen und mit 1 µl Matrix überschichtet, wobei die Lösungsbestandteile der Matrix (50 % Acetonitril (ACN) und 0,1 - 2,5 % Trifluoressigsäure (TFA)) eine ausreichende Lyse der bis dahin intakten bakteriellen Zellwand bewirkt, sodass die intrazellulären Proteine in Kokristallisation mit der Matrix treten (Wieser *et al.*, 2012; Bader, 2013).

Die Methode des direkten Transfers von intakten Hefezellen auf eine Targetplatte ist nur bedingt geeignet, da aufgrund des Gehaltes an Glucanen und Chitin eine erhöhte Zellwandstabilität besteht, was eine vorherige Behandlung zur Proteinextraktion mit lytischen Substanzen oder auch physikalischen Reizen obligat macht (van Veen *et al.*, 2010; Pinto *et al.*, 2011; Bader, 2013). Andernfalls kommt es in den meisten Fällen zu keiner verlässlichen Identifikation der aufgetragenen Isolate (Vlek *et al.*, 2014).

2.3.3.3 Verkürzte Proteinextraktion

Eine erweiterte Form der Direct Smear Methode stellt die verkürzte Form der Proteinextraktion dar (Pinto *et al.*, 2011; Bille *et al.*, 2012; Goyer *et al.*, 2012; Bernhard *et al.*, 2014), die in der Literatur auch Yeast-On-Target-Lysis (YOTL) genannt wird (Bernhard *et al.*, 2014).

Dabei wird ebenfalls eine sehr geringe Menge Koloniematerial direkt auf eine MALDI Targetplatte aufgetragen. Bevor diese jedoch mit Matrixlösung überschichtet wird, erfolgt die Lyse der Hefezellwände mit 1 µl 70 %iger Ameisensäure (Pinto *et al.*, 2011; Bader, 2013; Cassagne *et al.*, 2013; Bernhard *et al.*, 2014).

De Carolis *et al.* (2012) benutzten statt 70 %iger Ameisensäure reinsten Ethanol. Der Vorteil der YOTL im Vergleich zur Proteinextraktion mit Ethanol (100 %) und Ameisensäure (70 %) liegt in der Zeitersparnis und dem geringeren Aufwand, der für die Durchführung notwendig ist (Pinto *et al.*, 2011).

Mehrere Arbeitsgruppen haben sich mit der Modifizierung dieser Präparationsmethode zur Aufbereitung von Hefen beschäftigt (Bader *et al.*, 2011; Pinto *et al.*, 2011; Goyer *et al.*, 2012; Bader, 2013; Cassagne *et al.*, 2013; Bernhard *et al.*, 2014). Cassagne *et al.* (2013) untersuchten die unterschiedlichen Präparationsmethoden in einer vergleichenden Studie. Dabei machten sie die Beobachtung, dass es durch verkürzte Extraktionsverfahren, wie der Direct Smear Methode oder der YOTL, zu vermehrten Fehlidentifikationen kam. Vermutet wird hierfür eine unzureichende Lyse der Zellwand durch die verkürzte Präparationsmethode (Cassagne *et al.*, 2013).

Denn durch eine unvollständige Zellwandlyse von Hefen kommt es zu einer geringeren Anzahl Peaks mit niedrigerem S/N-Verhältnis, als dies bei der Extraktion der Fall ist (Bader, 2013). Daraus resultiert eine Identifikation mit schlechteren Score Values bei der Verwendung der Bruker-Datenbank, da in dieser Datenbank ausschließlich Referenzspektren auf Extraktionsbasis hinterlegt sind (Bader, 2013).

Im Falle anderer Systeme (Saramis; Andromas) wurden die hinterlegten Referenzdaten für Hefen auf Basis der YOTL erstellt, wodurch bei der Identifikation keine schlechteren Score Values zu erwarten sind (Iriart *et al.*, 2012; Bader, 2013). Eine bestmögliche Identifikation ist demnach immer dann gegeben, wenn die Präparationsmethode derjenigen der hinterlegten Referenzdaten entspricht (Bader, 2013). Aktuell ist die YOTL-Präparationsmethode insbesondere zur Identifikation klinisch relevanter Hefespezies beschrieben (Bader *et al.*, 2011; Pinto *et al.*, 2011; Cassagne *et al.*, 2013; Bernhard *et al.*, 2014).

2.3.4 Erstellung von Referenzspektren

Der Abgleich von Massenspektren mit den Herstellerdatenbanken erfolgt mit Referenzspektren, für die je nach Herausgeber entweder für jedes Isolat einer Spezies einzelne Referenzspektren hinterlegt sind (MALDI Biotyper, Bruker Daltoniks, Bremen) oder deren Referenzspektren aus Superspektren, die Massenspektren mehrerer Isolate enthalten, bestehen (Saramis, Biomérieux, Nürtingen).

Für die Erstellung eines Summenspektrums mit der Software MALDI Biotyper (Bruker Daltoniks) existieren Vorgaben zur Verwendung der Spektren durch den Hersteller. Vor der Erstellung von Referenzspektren erfolgt die Kalibrierung des Massenspektrometers mit einem *Escherichia coli*-Bakterienstandard (Bacterial Test Standard (BTS), Bruker Daltoniks) mit zugesetzten Massen im Bereich von 3 637,80 bis 16 952,30 Da. Ein Referenzspektrum besteht den Vorgaben zufolge aus ≥ 20 Einzelspektren (Anonymous, 2012). Dabei sollten pro Spektrum mindestens 25 Massen mit einer minimalen Auflösung von 400 enthalten sein, wovon 20 Massen eine Auflösung von 500 aufweisen müssen (Stevenson *et al.*, 2010). Die Auflösung ist dabei definiert als das Masse-zu-Ladung-Verhältnis (m/z) dividiert durch die Peakbreite bei 50 % des Peakmaximums (Lottspeich, 2006).

Wurden den Vorgaben entsprechende Spektren für eine Spezies erstellt, erfolgt die automatisierte Berechnung eines Summenspektrums aus der Aufsummierung von mindestens 20 Einzelspektren durch die Software Biotyper OC (Bruker Daltoniks).

2.3.5 Einfluss der Anzuchtbedingungen auf die Zellwand von Hefen

Die Reproduzierbarkeit der Massenspektren von Hefen kann von umweltbedingten sowie physiologischen Schwankungen beeinträchtigt werden (Qian *et al.*, 2008; Usbeck *et al.*, 2013). In diesem Zusammenhang berichten verschiedene Studien darüber, dass sich das massenspektrometrische Erscheinungsbild von Hefen in Abhängigkeit zu den kulturellen Bedingungen ändern kann (Qian *et al.*, 2008; Usbeck *et al.*, 2013). Beispielsweise kann die An- oder Abwesenheit von Sauerstoff während der Kultivierung zu minimalen massenspektrometrischen Divergenzen führen (Usbeck *et al.*, 2013). Auch die Dauer der Inkubation und die Temperatur können das Massenspektrum beeinflussen, was jedoch Stamm-abhängig zu sein scheint. Die Unterschiede in den Spektren ergeben sich dabei vor allem im höheren Massenbereich (Qian *et al.*, 2008).

In der Literatur finden sich einige Untersuchungen zur Zusammensetzung der Zellwand von *S. cerevisiae*, aber auch anderen Pilzen (Kollar *et al.*, 1997; Klis *et al.*, 2002; Aguilar-Uscanga und François, 2003; Ruiz-Herrera und Ortiz-Castellanos, 2010). Die Hefezellwand besteht hauptsächlich aus einem dynamischen Komplex an Polysacchariden, der unter dem Einfluss modulierender Enzyme in der Lage ist, sich an physiologische Veränderungen der Umwelt anzupassen (Kollar *et al.*, 1997; Kapteyn *et al.*, 2001; Klis *et al.*, 2002; Aguilar-Uscanga und François, 2003).

Dabei können drei Hauptbestandteile unterschieden werden: Mannoproteine mit einem Anteil von etwa 40 %, β -Glucan zu etwa 60 % und N-Acetylglucosamin (Chitin) zu etwa 2 % (Kollar *et al.*, 1997; Klis *et al.*, 2002).

Weiterhin sind Hefen in der Lage, auf Zellwand schädigende Agenzien durch die Aktivierung von Reparaturmechanismen zu reagieren, was ihnen eine Erhöhung der Zellwandstabilität und die Möglichkeit der Wiederherstellung beschädigter Zellwandabschnitte erlaubt. Einer dieser Mechanismen ist die Erhöhung des Chitingehaltes in der Zellwand auf bis zu 20 % (Klis *et al.*, 2002). Daneben wird die Vernetzung der langkettigen und kurzkettigen Anteile des β -Glucans als weiterer Modulationsmechanismus bezüglich der Widerstandskraft der Zellwand gegen schädigende Einflüsse diskutiert (Kollar *et al.*, 1997; Aguilar-Uscanga und François, 2003). Die Arbeitsgruppe um Aguilar-Uscanga *et al.* (2003) beschäftigte sich in diesem Zusammenhang mit den Einflüssen der zur Verfügung stehenden Substrate auf die Zellwandmodulation und der sich daraus ergebenden Sensitivität auf das lytische Enzym Zymolase (Tabelle 6).

Dabei konnte bestätigt werden, dass die Polymerzusammensetzung der Zellwand von den der Hefe zur Verfügung stehenden Kohlenhydratquellen beeinflusst wird. Dabei zeigten Hefezellen aus Maltose- und Galaktosekulturen einen erhöhten Gehalt an Gesamt- β -Glucan von 19 % mit einer einhergehenden geringeren Sensitivität auf Zymolase, während bei Hefezellen aus Glucose-, Mannose- und Sucrosemédien mit einem Gesamt- β - Glucan-Gehalt von 14 % kein veränderter Einfluss des Enzyms auf die Lyse der Zellwände beobachtet werden konnte. Bei der Anzucht der Hefen auf Hefeextrakt-Pepton-Agar (YPD- Agar) war im Vergleich zum Wachstum auf Hefe-Nitrogen-Bactopepton-Medium (YNB- Medium) eine Verdopplung des β -Glucan-Gehaltes mit gleichzeitiger Abnahme der Lysierbarkeit der Zellwände zu verzeichnen. Bei der Überprüfung des Temperatureinflusses konnte eine positive Korrelation zwischen Chitingehalt und Temperatur festgestellt werden (Tabelle 6). Mit steigender Temperatur von +22 bis +37 °C kam es zu einer Erhöhung des Chitingehaltes in der Zellwand von 5,2 % auf bis zu 7,9 %. Die Untersuchung des Einflusses auf die Zellwandzusammensetzung in Bezug auf die Abwesenheit von Sauerstoff ergab eine Reduktion der Trockenmasse um 25 % und einen verringerten Gehalt an Chitin unter anaeroben Bedingungen. Der Gehalt an β -Glucan und Mannan war dagegen nicht beeinflusst (Aguilar-Uscanga und François, 2003).

Außerdem bestand ein Zusammenhang zwischen Temperatur und lytischer Sensitivität (Tabelle 6). Je höher die Kultivierungstemperatur war, desto geringer war die maximale Lyserate. Auch ein niedriger pH-Wert senkt die Empfindlichkeit der Hefen auf lytische Enzyme, was vermutlich mit der stärkeren Vernetzung Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-abhängiger Zellwandproteine in Verbindung steht (Kapteyn *et al.*, 2001; Aguilar-Uscanga und François, 2003).

Durch die jeweiligen Inkubations- und Wachstumsbedingungen kommt es zu einer Modulation der Zellwandzusammensetzung von Hefezellen. Daher kann die vollständige mechanische oder lytische Aufspaltung von Hefezellwänden unter Umständen durch deren erhöhte Stabilität beeinträchtigt sein (Aguilar-Uscanga und François, 2003), was sich wiederum auf die Reproduzierbarkeit der Massenspektren auswirken kann (Usbeck *et al.*, 2013)

Tabelle 6: Effekte der Wachstumsbedingungen auf Masse der Zellwand, Chitingehalt, Mannan, β -Glucan, β -1,6-Glucan und auf die Sensitivität intakter Zellen auf Zymolase {Aguilar-Uscanga, 2003}

Anzucht- bedingung	Wachstums- rate	Zellwand (TM (%))	Chitin (Zellwandge- halt (%))	Mannan (Zellmasse $\mu\text{g mg}^{-1}$)	Gesamtes β - Glucan (Zellmasse $\mu\text{g mg}^{-1}$)	Gesamtes β -1,6-Glucan (%)	Zymolase- sensitivität (max. Lyserate) ($\times 10^{-2}$)
YPD	0,42	24,5 \pm 2,5	6,2 \pm 0,55	93,3 \pm 3,2	127,4 \pm 3,2	18 \pm 3,0	0,28
YNB	0,35	21,2 \pm 2,4	3,0 \pm 0,17	89,5 \pm 3,5	72,6 \pm 4,1	18 \pm 2,5	0,32
CF	0,36	20,4 \pm 2,8	2,4 \pm 0,23	86,5 \pm 1,7	71,4 \pm 3,3	15 \pm 2,0	0,68
Glucose	0,36	18,3 \pm 2,0	5,2 \pm 0,32	92,7 \pm 2,7	62,5 \pm 2,9	14 \pm 2,5	0,75
Mannose	0,33	14,2 \pm 1,8	4,3 \pm 0,17	59,7 \pm 1,7	64,3 \pm 1,7	14 \pm 2,2	0,66
Sucrose	0,39	15,2 \pm 1,8	4,8 \pm 0,32	53,6 \pm 2,8	62,7 \pm 3,1	13 \pm 3,6	0,68
Maltose	0,31	14,5 \pm 2,0	4,2 \pm 0,09	54,7 \pm 3,2	50,6 \pm 1,8	16 \pm 2,7	0,35
Galactose	0,23	16,4 \pm 2,0	4,7 \pm 0,25	45,3 \pm 2,6	78,2 \pm 2,3	19 \pm 3,2	0,15
Ethanol	0,13	10,8 \pm 1,5	6,4 \pm 0,35	57,8 \pm 2,6	38,7 \pm 3,4	21 \pm 2,4	0,03
pH 3	0,22	17,9 \pm 3,0	6,9 \pm 0,4	62,1 \pm 2,1	60,4 \pm 2,6	15 \pm 2,0	0,49
pH 4	0,32	18,9 \pm 2,0	7,1 \pm 0,4	57,6 \pm 1,5	80,8 \pm 3,6	17 \pm 3,0	0,62
pH 5	0,36	20,5 \pm 2,0	5,5 \pm 0,6	92,7 \pm 2,7	66,5 \pm 2,9	14 \pm 2,0	0,75
pH 6	0,29	14,1 \pm 1,6	6,4 \pm 1,4	54,2 \pm 3,4	58,4 \pm 3,2	12 \pm 1,5	0,86
22 °C	0,19	12,4 \pm 2,1	5,2 \pm 0,5	41,6 \pm 1,3	60,1 \pm 1,3	10 \pm 2,0	0,85
30 °C	0,36	18,3 \pm 2,6	5,5 \pm 0,2	94,5 \pm 2,7	68,5 \pm 4,5	14 \pm 2,0	0,75
37 °C	0,44	15,5 \pm 2,0	7,9 \pm 0,9	47,5 \pm 1,3	88,9 \pm 4,9	20 \pm 2,0	0,59
pO ₂ ~ 0 %	0,33	14,2 \pm 2,1	1,4 \pm 0,5	94,8 \pm 1,5	60,1 \pm 3,1	nd	nd
pO ₂ > 50 %	0,44	18,6 \pm 2,0	5,2 \pm 0,3	92,7 \pm 2,7	62,5 \pm 2,9	nd	nd

CF: synthetisches Mineralmedium; TM: Trockenmasse; pO₂: Sauerstoffpartialdruck; YPD: Yeastextrakt-Pepton-Agar; YNB: Yeast-Nitrogen-Bactopepton-Medium; nd: nicht durchgeführt

Am Beispiel *C. albicans* Stamm 3153A konnten signifikante Unterschiede im Massenbereich zwischen m/z 11,341, 12,279 und 13,161 Da festgestellt werden, indem das Isolat zum einen bei unterschiedlichen Temperaturen (+22 °C und +37 °C) und zum anderen unterschiedlich lange inkubiert wurde (2 Tage und 4 Tage). Während nach einer Inkubationsdauer von 2 Tagen signifikante Peaks im genannten Massenbereich messbar waren (blaue Markierung, Abbildung 10d), konnten diese nach 4 Tagen Inkubationsdauer nicht mehr nachgewiesen werden (Abbildung 10c). Auch bei anderen Stämmen von *C. albicans* konnten diese Unterschiede in Abhängigkeit zu den Inkubationsbedingungen nachgewiesen werden (Abbildung 10a, b, e, f) (Qian *et al.*, 2008).

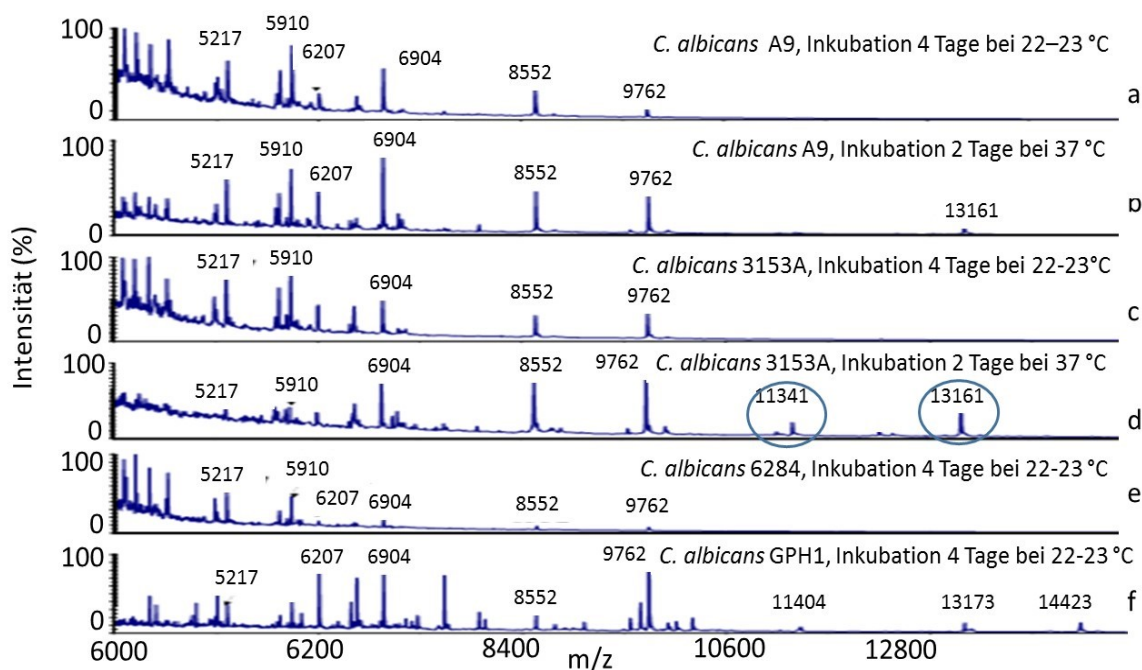


Abbildung 10: MALDI-TOF-Spektren für unterschiedliche Stämme von *C. albicans* auf Glucose-Hefeextrakt-Pepton-Agar; stammabhängige Massenunterschiede in Abhängigkeit der Anzuchtbedingungen (blaue Markierungen) (Qian *et al.*, 2008)

Keinen nachweisbaren Einfluss auf die Spektren haben laut Usbeck *et al.* (2013) die während der Kultivierung zur Verfügung stehenden Substrate. Sie untersuchten auch den Einfluss verschiedener Umweltbedingungen auf die Reproduzierbarkeit der Massenspektren Verderb induzierender Hefen aus Getränken. Dabei konnten auch bezüglich der Wachstumsphase in den spezifischen Fingerprints der Hefen *S. cerevisiae*, *W. anomalus* und *D. hansenii* leichte Unterschiede der Spektren beobachtet werden, wobei die aussagekräftigsten Massen immer vorhanden waren. Der Einsatz einer unterschiedlichen Zelldichte und das zur Verfügung stehende Substrat hatten laut Usbeck *et al.* (2013) keinen qualitativen oder quantitativen Einfluss auf die Peaks.

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Material

3.1.1 Anzahl und Herkunft der untersuchten Wildstämme

Insgesamt wurden 47 Hefe-Isolate aus 22 unterschiedlichen Fleischproben untersucht (Abbildung 11). Von den 22 Fleischproben galten 17 Proben als frisch ohne erkennbare Verderbsanzeichen. Davon wurden 13 Fleischproben im Rahmen einer anderen Studie aus dem globalen Handel beschafft (Paniora, 2014), 4 der frischen Proben stammten aus Routineuntersuchungen des Lehrstuhls für Lebensmittelsicherheit in Oberschleißheim.

Bei den verdorbenen Proben handelt es sich um vakuumverpacktes Rindfleisch (n=4), sowie vakuumverpacktes Hähnchenfleisch (n=1). Die Fleischproben wurden zur Untersuchung an den Lehrstuhl für Lebensmittelsicherheit in Oberschleißheim gesendet, da sie durch eine stark aufgeblähte Umverpackung (Blown Pack) vor Ablauf des Mindesthaltbarkeitsdatums auffielen (Bonke *et al.*, 2016b).

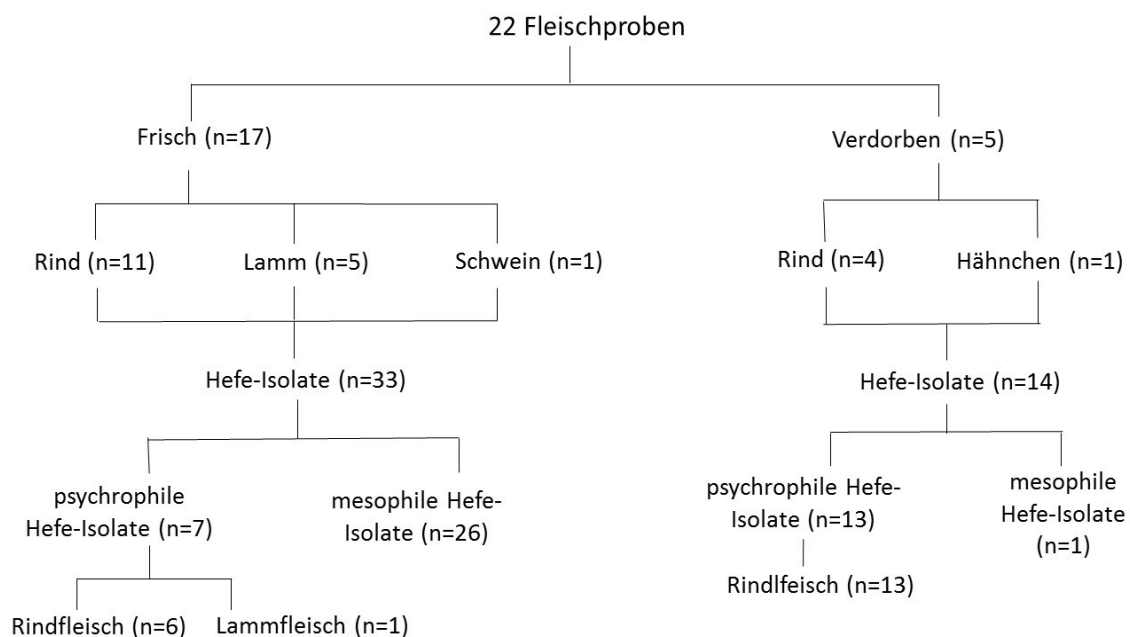


Abbildung 11: Übersicht zum Ursprung der untersuchten Hefe-Isolate

Aus den frischen Fleischproben wurden im Gesamten 33 Hefe-Isolate untersucht, von denen für 7 Isolate eine Psychrophilie nachgewiesen werden konnte. Aus den verdorbenen Fleischproben wurde eine Psychrophilie für 13 Hefe-Isolate nachgewiesen, sodass insgesamt 20 psychrophile Hefe-Isolate für nachfolgende Untersuchungen verwendet wurden (Tabelle 7). Sechs dieser psychrophilen Hefe-Isolate stammten aus frischem vakuumverpacktem Rindfleisch, ein psychrophiles Isolat aus frischem Lammfleisch (Paniora, 2014). Die anderen psychrophilen Isolate (n=13) stammten aus verdorbenem Rindfleisch (Tabelle 7).

Bis zu ihrer genaueren Untersuchung wurden die aus Rindfleisch bzw. Lammfleisch isolierten Hefen bei -80 °C gelagert.

Tabelle 7: Herkunft der untersuchten psychrophilen Hefe-Isolate

Nr.	Probenart	Verpackungsart	Herkunft	Status	MHD
1	Rindfleisch	Vakuumbbeutel	Deutschland	Verdorben	nicht
2	Rindfleisch	Schrumpffolie	Deutschland	Verdorben	nicht
3	Rindfleisch	Schrumpffolie	Deutschland	Verdorben	nicht
4	Rindfleisch	Schrumpffolie, defekt	Deutschland	Verdorben	nicht
5	Rindfleisch	Schrumpffolie, defekt	Deutschland	Verdorben	nicht
6	Rindfleisch	Schrumpffolie	Deutschland	Verdorben	nicht
7	Rindfleisch	Schrumpffolie, defekt	Deutschland	Verdorben	nicht
8	Rindfleisch	Schrumpffolie	Deutschland	Verdorben	nicht
9	Rindfleisch	Schrumpffolie, defekt	Deutschland	Verdorben	nicht
10	Rindfleisch	Schrumpffolie, defekt	Deutschland	Verdorben	nicht
11	Rindfleisch	Schrumpffolie	Deutschland	Verdorben	nicht
12	Rindfleisch	Schrumpffolie	Deutschland	Verdorben	nicht
13	Rindfleisch	Schrumpffolie	Deutschland	Verdorben	nicht
14	Rindfleisch	Vakuumbbeutel	Australien	Frisch	erreicht
15	Rindfleisch	Vakuumbbeutel	Australien	Frisch	erreicht
16	Rindfleisch	Vakuumbbeutel	Argentinien	Frisch	erreicht
17	Rindfleisch	Vakuumbbeutel	Argentinien	Frisch	erreicht
18	Rindfleisch	Vakuumbbeutel	Australien	Frisch	erreicht
19	Lammfleisch	Vakuumbbeutel	Deutschland	Frisch	erreicht
20	Rindfleisch	Vakuumbbeutel	Deutschland	Frisch	erreicht

MHD: Mindesthaltbarkeitsdatum

3.1.2 Herkunft der Hefe-Referenzstämme

Als Grundlage der Charakterisierung und der massenspektrometrischen Erstellung von Referenzspektren für die untersuchten Isolate dienten verschiedene *Kazachstania* spp.-Referenzstämme der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) in Braunschweig und dem Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS) in Utrecht (Tabelle 8). Sie wurden als Lyophilisate bezogen und nach den Vorgaben der Hersteller bei +25 °C auf GYP-Agar kultiviert.

Tabelle 8: Übersicht über die verwendeten Hefe-Referenzstämme

Speziesbezeichnung	Stammnummer	Herkunft	Anzuchtbedingung
<i>C. albicans</i>	ATCC 10231	menschliche Lunge	YEPD; +24 bis 26 °C
<i>K. psychrophila</i>	DSM 26230	Rindfleisch, vakuumverpackt	Hefeuniversalmedium; +10 °C
<i>K. lodderae</i>	CBS 2757	Boden, Südafrika	GYP; +25 °C
<i>K. unispora</i>	CBS 398	unbekannt	GYP; +25 °C
<i>K. servazzii</i>	CBS 4311	Boden, Finnland	GYP; + 25 °C

ATCC: American Type Culture Collection; DSM: Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH; CBS: Centralbureau voor Schimmelcultures; *C.*: *Candida*; GYP: Glucose-Hefeextrakt-Pepton-Agar; *K.*: *Kazachstania*; YEPD: Yeast-Extrakt-Pepton-Dextrose-Agar

Für die Spezifitätsprüfung der erstellten Referenzspektren wurden Hefespezies aus überwiegend frischem, teilweise aus verdorbenem Fleisch aus der Stammsammlung des Lehrstuhls für Lebensmittelsicherheit verwendet. Zusätzlich wurden bei der DSMZ (Braunschweig) die psychrophilen Referenzstämme *M. frigida* DSM 4634 und *M. gelida* DSM 70882 bezogen (Tabelle 9)

Tabelle 9: Übersicht über die verwendeten Hefe-Isolate und Referenzstämme für die Exklusivitätsprüfung

Speziesbezeichnung (n)	Isolatnummer	Eigenschaft	Herkunft	Status
<i>B. albus</i> (1)	RD-AR.8.4.3	mesophil	Rindfleisch, Argentinien	Frisch
<i>C. zeylanoides</i> (5)	LA-DE.5.1.3	mesophil	Lammfleisch, Deutschland	Frisch
	LA-DE.8.4.4	mesophil	Lammfleisch, Deutschland	Frisch
	RD-IE.3.1.4	mesophil	Rindfleisch, Irland	Frisch
	RD-AR.8.1.5	mesophil	Rindfleisch, Argentinien	Frisch
<i>C. sake</i> (4)	RD-UR.1.1.3	mesophil	Rindfleisch, Uruguay	Frisch
	LA-IE.5.9.3	mesophil	Lammfleisch, Irland	Frisch
	RD-US.1.2.3.	mesophil	Rindfleisch, USA	Frisch
	RD-DE.4.1.3	mesophil	Rindfleisch, Deutschland	Frisch
	RD-FR.2.1.5	mesophil	Rindfleisch, Frankreich	Frisch
	LA-IE.5.10.4	mesophil	Lammfleisch, Irland	Frisch
<i>Cr. curvatus</i> (3)	LA-WA.1.2.3	mesophil	Lammfleisch, Wales	Frisch
	RD-DE.11.1.4	mesophil	Rindfleisch, Deutschland	Frisch
<i>Fungal</i> spp.	LA-WA.5.1	mesophil	Lammfleisch, Wales	Frisch
	RD-NZ.8.3.2	mesophil	Rindfleisch, Neuseeland	Frisch
<i>Rh. glutinis</i> (2)	RD-IE.3.2.3	mesophil	Rindfleisch, Irland	Frisch
	2014/152/1016.6	mesophil	Schweinefleisch, Deutschland	Verdorben
<i>Rh. mucilaginosus</i> (2)	LA-IE.5.8.6	mesophil	Lammfleisch, Deutschland	Frisch
	2014/152/1019.3	mesophil	Schweinefleisch, Deutschland	Verdorben
<i>W. anomalus</i> (1)	RD-NL.2.2.3	mesophil	Rindfleisch, Niederlande	Frisch
<i>M. frigida</i> (1)	DSM 4643	psychrophil	Boden, Ross Island, Antarktis	-
<i>M. gelida</i> (1)	DSM 70882	psychrophil	Boden, Antarktis	-

n: Anzahl; *B.*: *Bulleromyces*; *C.*: *Candida*; *Cr.*: *Cryptococcus*; *M.*: *Mrakia*; *Rh.*: *Rhodotorula*; *W.*: *Wickerhamomyces*; *DSM*: Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (Braunschweig); -: ohne Angabe

3.2 Methoden

3.2.1 Kulturelle Verfahren

3.2.1.1 Überprüfung des temperaturabhängigen Wachstums

Durch einen Dreiösenaustrich wurden jeweils fünf Columbia-Schafblutagarplatten (CBA, Oxoid, Wesel) je Isolat unter der mikrobiologischen Sicherheitswerkbank (INTEGRA Biosciences, Biebertal) beimpft. Anschließend erfolgte eine Inkubation jeweils einer Platte über mindestens 6 Tage bei den Temperaturen +4 °C, +10 °C, +15 °C, +20 °C und +25 °C, um die Isolate auf tatsächliche Psychrophilie zu überprüfen. Diese galt dabei als bestätigt, wenn ein Koloniewachstum zwischen +4 °C und $\leq +20$ °C erkennbar war, jedoch nicht bei $> +20$ °C. Ein Wachstum zwischen +4 °C und +25 °C bestätigte lediglich eine Psychrotoleranz.

Parallel wurde eine Überprüfung der psychrophilen Eigenschaft des Referenzstamms *K. psychrophila* DSM 26230 im Vergleich zu den übrigen verwendeten *Kazachstania* spp. (Tabelle 8) durchgeführt, da dies gemäß Kabisch *et al.* (2013) neben der Osmotoleranz bis zu einer Konzentration von 16 % NaCl, als Hauptcharakteristikum für die Unterscheidung von *K. psychrophila* von anderen *Kazachstania* spp. gilt.

3.2.1.2 Plattenmorphologische Beurteilung

Im Fall einer bestätigten Psychrophilie wurden die Isolate auf Malz-Extrakt-Agar plus Novobiocin (MEA⁺), Glucose-Hefeextrakt-Peptone (GYE)-Agar, Hefeextrakt-Glucose-Chloramphenicol (YGC)-Agar und Sabouraud (SAB)-Agar subkultiviert und für mindestens 14 Tage bei +10 °C unter aeroben Bedingungen inkubiert.

Währenddessen fand eine morphologische Koloniebeschreibung der Wildstämme, sowie aller *Kazachstania* spp.-Referenzstämme nach 2, 7 und 14 Tagen auf den unterschiedlichen Nährmedien statt (Tabelle 10).

Tabelle 10: Beurteilungskriterien für die koloniemorphologische Beurteilung (Kurtzman *et al.*, 2011)

Kriterium	Morphologische Beschreibung
Wachstum	kein; wenig; mäßig; stark
Farbe	cremefarben; gelblich; elfenbein; weiß
Koloniegröße	Durchmesser in mm
Oberfläche	matt; matt-glänzend; glänzend
Beschaffenheit der Ränder	glatt; gelappt
Erhebung	kugelförmig; halbkugelförmig; verlaufen
Textur	buttrig; cremig; schleimig
Geruch	nicht, leicht, mäßig, stark hefig

3.2.2 Lichtmikroskopische Untersuchung

Im Anschluss an die koloniemorphologische Beurteilung auf den verschiedenen Kulturmedien wurde von jedem Isolat und Medium eine lichtmikroskopische Untersuchung vorgenommen, um Aufschluss über die Zellmorphologie und das Wachstumsverhalten in Abhängigkeit zum Nährmedium zu erhalten.

Dazu wurde jeweils nach 6 Tagen aerober Inkubation bei +10 °C ein Nativpräparat angefertigt. Auf einen Objektträger wurde je ein Tropfen isotonische Natriumchlorid-(NaCl)-Lösung gegeben und darin eine koloniebildende Einheit (KBE) suspendiert. Das Nativpräparat wurde mit einem Deckglas überdeckt und unter dem Lichtmikroskop (Leica, Wetzlar) bei 100-facher Vergrößerung betrachtet, wobei die Größe, die Zellform, das Fortpflanzungsverhalten, sowie die mögliche Ausbildung von Pseudohyphen in Abhängigkeit zum jeweiligen Nährmedium dokumentiert wurden. Zusätzlich wurde von den Isolaten auf MEA⁺ ein Grampräparat angefertigt.

3.2.3 Biochemische Untersuchung

Zu Beginn der Studie erfolgte die biochemische Untersuchung der psychrophilen Hefe-Isolate mit den kommerziell erhältlichen Testkits API 20 C AUX[®] und API Candida[®] (Biomérieux, Nürtingen), die entgegen der Herstellerangaben bei +10 °C inkubiert wurden. Bei der empfohlenen Inkubationstemperatur des Herstellers von +35 °C war aufgrund der Psychrophilie keine Reaktion zu erwarten. Da bei der Auswertung dieser Testsysteme größtenteils uneindeutige Ergebnisse festgestellt wurden, wurde das biochemische

Testverfahren auf Zuckerfermentationsteströhrchen der Firma Liofilchem® (Roseto degli Abruzzi, Italien) umgestellt.

Dabei wurden insgesamt 20 verschiedene Zuckerteströhrchen (Adonitol, Arabinose, Arabitol, Dulcitol, Galactose, D-Glucose, Inositol, Inulin, Lactose, Levulose, Maltose, Mannitol, Mannose, Raffinose, Rhamnose, Salicin, Sorbitol, Sucrose, α -Trehalose und D- Xylose) mit jeweils 300 μ l steriler 0,9 %iger NaCl-Lösung versetzt und darin jeweils 1 KBE der Hefe-Isolate, sowie des Referenzstammes DSM 26230 mit einer sterilen Impföse suspendiert. Bis zur Testauswertung erfolgte die Inkubation der Fermentationstests bei +10 °C über 24 Stunden. Bei einer erkennbaren langsamen Testreaktion wurde der Inkubationszeitraum auf bis zu 72 Stunden ausgedehnt.

3.2.4 Molekularbiologische Verfahren

3.2.4.1 DNA-Extraktion

Für die Extraktion der DNA aus den Hefezellen wurde das DNeasy Blood&Tissue Kit® (Qiagen, Hilden) verwendet. Jedoch wurden die Isolate nach einem modifizierten Extraktionsprotokoll (Dorn-In *et al.*, 2013) behandelt, bevor mit dem Protokoll nach Herstellerangaben weiter verfahren wurde. Dazu wurden die Hefe-Isolate zuvor auf MEA⁺ überimpft und bei +10 °C für 72 Stunden aerob inkubiert. Mit einer sterilen Einmalöse (1 μ l) wurden anschließend drei bis vier Einzelkolonien mit einem Durchmesser von 1 mm abgenommen und in einen mit 250 mg Glasperlen und 200 μ l PBS-Puffer befüllten Eppendorf-Cup (1,5 ml) gerieben. Abschließend wurden die Proben für 1 min bei 30 Hz im Tissue Lyser (Qiagen) geschüttelt.

Im nächsten Schritt wurden die Isolate mit 200 μ l Lysepuffer und 25 μ l Proteinase K versetzt, wonach sie für 10 min bei +70 °C im Thermomixer (Eppendorf, Hamburg) inkubiert wurden. Da es sich bei den Isolaten um Reinkulturen handelte, wurde auf den Zusatz von Lyticase, wie im Herstellerprotokoll vorgesehen, verzichtet. Nach der Inkubation wurden 200 μ l reiner Ethanol zugefügt, bevor 500 μ l der Lösung abpipettiert und in ein Zentrifugationsröhrchen (Qiagen) überführt wurden. Im weiteren Verlauf wurde nach den Angaben des Extraktionsprotokolls des Herstellers verfahren.

3.2.4.2 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Für die Identifizierung der Hefe-Isolate wurde die D1/D2 Domäne des 26S rDNA Gens verwendet (Primerpaar NL1/4) (Kurtzman und Robnett, 1998; Libkind *et al.*, 2003) und gegebenenfalls mit der ITS-Domäne ergänzt (Primerpaar ITS1/4) (White *et al.*, 1990; Martin und Rygielwicz, 2005). Der für die PCR mit den Primerpaaren NL1/4 benötigte Mastermix wurde anhand des in Tabelle 11 angegebenen Pipettierschemas erstellt. Pro Ansatz ergab sich ein Gesamtvolumen von 50 µl, welches sich aus 45 µl Mastermix und 5 µl Templat zusammensetzte. Der Mastermix (Qiagen) für die PCR mit den Primerpaaren ITS1/4 wurde anhand des in Tabelle 12 angegebenen Pipettierschemas hergestellt (Paniora, 2014), wobei sich ein Ansatz aus je 40 µl Mastermix und 10 µl Templat zusammensetzte.

Tabelle 11: Mastermixherstellung für die PCR (Primer NL1/4) zur Sequenzierung von Hefen (Erl-Höning, 2014)

Reagenz	Menge pro Ansatz (µl)	Konzentration
PCR Buffer Gold	5	1x
MgCl ₂	3	25 mM
dNTP Mix	5	2 mM
Primer NL1	1	10 µM
Primer NL4	1	10 µM
AmpliTaq Gold	0,5	0,05 U/µl
Wasser (für molekular-biologische Zwecke)	29,5	
Templat	5	

Tabelle 12: Mastermixherstellung für die PCR (Primer ITS1/4) zur Sequenzierung von Hefen (Paniora, 2014)

Reagenz	Menge pro Ansatz (µl)	Konzentration
HotStar Mastermix (Qiagen)	25	2x
DNAse freies Wasser	13	-
Primer ITS1	1	10 µM
Primer ITS4	1	10 µM
Templat	10	

Bei jeder PCR wurde stets eine Negativkontrolle mit Wasser für molekularbiologische Zwecke mitgeführt. Die Amplifikation der DNA-Extrakte im Thermocycler (Bio-Rad, München) erfolgte nach dem Protokoll (Tabelle 13) aus Erl-Höning (2014) in Anlehnung an Kurtzman und Robnett (1998) für die PCR mit den Primern NL1/4, sowie für die PCR mit den Primern ITS1/4 nach dem Protokoll in Tabelle 14 (Paniora, 2014).

Tabelle 13: PCR-Cyclerprotokoll für die DNA-Amplifikation von Hefen zur Sequenzierung (Primer NL1/4) (Erl-Höning, 2014)

Schritt	Anzahl der Zyklen	Temperatur	Dauer
Initiale Denaturierung	1x	95 °C	10
Denaturierung	40x	92 °C	40 sec
Annealing		55 °C	40 sec
Elongation		72 °C	30 sec
Elongation	1x	72 °C	10

Tabelle 14: PCR-Cyclerprotokoll für die DNA-Amplifikation von Hefen zur Sequenzierung (Primer ITS1/4) (Paniora, 2014)

Schritt	Anzahl der Zyklen	Temperatur	Dauer
Initiale Denaturierung	1x	95 °C	10
Denaturierung	45x	95 °C	20 sec
Annealing		52 °C	30 sec
Elongation		72 °C	90 sec
Elongation	1x	72 °C	10

Nach Abschluss der PCR wurden die Amplifikate auf ein 2 %iges Agarosegel (Bio-Rad) in einem Gemisch aus 4 µl PCR-Amplifikat und 1 µl Ladepuffer (Bioline, Luckenwalde) aufgetragen. Als DNA-Längenstandard wurde 5 µl Hyperladder IV (Bioline) verwendet.

Nach der elektrophoretischen Auftrennung der DNA-Amplifikate bei 140 V über 60 min in der Elektrophoresekammer (Bio-Rad) erfolgte die Anfärbung der Banden mit 1 %iger Ethidiumbromidlösung (Bio-Rad) über 20 min und anschließender Sichtbarmachung mittels UV-Transilluminator (Bio-Rad). Durch die verwendeten Primerpaare NL1 und NL4 entstanden Amplifikate in der Größe von 680 Basenpaaren (bp) bzw. von 500-900 bp im Falle der Amplifikate mit den Primerpaaren ITS1/4.

3.2.4.3 Aufreinigung der PCR-Amplifikate zur Sequenzierung

Nach positiv verlauter PCR wurden die erhaltenen DNA-Amplifikate für die anschließende Sequenzierung mit Hilfe des Qiaquick PCR Purification Kit® (Qiagen) nach Herstellerangaben aufgereinigt. Anschließend wurde die DNA-Konzentration mittels Photometer (Eppendorf) bei 600 nm bestimmt, um eine Mindestkonzentration von 5 ng/µl dsDNA für die Sequenzierung sicherzustellen. Im Falle eines erhöhten DNA-Gehaltes in der Probe wurde diese mit Wasser für molekularbiologische Zwecke auf die benötigte Konzentration verdünnt. Auch die verwendeten Primerpaare NL1 und NL4 bzw. ITS1 und ITS4 wurden um den Faktor 1:10 verdünnt, sodass eine Primerkonzentration von 10 pmol/µl vorlag.

Die Proben wurden zur Analyse ihrer Basenabfolge an die Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg) geschickt und die Gensequenzen mit den hinterlegten Sequenzen bei der NCBI Datenbank (2015) verglichen. Die D1/D2-Domäne jedes Isolates wurde insgesamt zwei Mal sequenziert, um das Ergebnis abzusichern. Weiterhin wurden die erhaltenen Gensequenzen mit Hilfe des Statistikprogrammes Bionumerics 7.5™ (AppliedMath, Sint-Martens-Latem, Belgien) ausgewertet, um die Basenabfolge der Isolate miteinander vergleichen zu können.

3.2.5 Massenspektrometrische Identifikation psychrophiler Hefespezies

3.2.5.1 Präparationsmethoden

Bezüglich der Präparation für die massenspektrometrische Untersuchung von Mikroorganismen stehen verschiedene Verfahren zur Verfügung. Ziel der Präparationsverfahren ist dabei die Lyse der Zellwand, um dadurch die Extraktion der intrazellulären Proteine zu erreichen (Anonymous, 2014).

3.2.5.1.1 Proteinextraktion

Für die Methode der Proteinextraktion mit Ethanol (100 %) und Ameisensäure (70 %) wurde mit einer sterilen Einmalöse (1 µl) Koloniematerial, welches zuvor über 72 Stunden bei +10 °C aerob auf SAB-Agar inkubiert wurde, von der Platte abgenommen und in einem Reaktionsgefäß (1,5 ml) mit 300 µl Aqua bidestillata suspendiert. Nach Zugabe von 900 µl

reinstem Ethanol (Merck, Darmstadt) wurden die Proben bei 13 000 rpm über 2 min zentrifugiert. Daraufhin wurde der Überstand abpipettiert und verworfen.

Nach einigen Minuten der Lufttrocknung wurde das erhaltene Pellet mit 30 bis 50 µl Ameisensäure (70 %) resuspendiert und über 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Menge der Ameisensäure richtete sich dabei nach der Größe des erhaltenen Pellets. Im weiteren Verfahren wurde eine der Ameisensäure äquivalente Menge Acetonitril (ACN) (Geyer, Renningen) zugegeben und nach vorsichtigem Mischen nochmals für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Extrakte bei 13 000 rpm über 2 min zentrifugiert.

Im letzten Schritt wurde jeweils 1 µl des erhaltenen Extraktes auf den Probenspot eines MALDI MTP 384 Targets (Bruker Daltoniks) aufgetragen und nach dem Trocknen mit je 1 µl CHCA-Matrix (Bruker Daltoniks) überschichtet. Für jedes Extrakt wurden mindestens drei technische Replikate angefertigt, wobei für die Erstellung eines MSP 30 Probenspots präpariert wurden. Die Messung erfolgte anschließend mit dem Autoflex Speed Massenspektrometer (Bruker Daltoniks).

3.2.5.1.2 Verkürzte Proteinextraktion

Für die verkürzte Form der Proteinextraktion (Yeast On Target Lysis, YOTL), die inzwischen in mehreren klinischen Laboratorien Anwendung findet (Goyer *et al.*, 2012; Iriart *et al.*, 2012; Bader, 2013), wurde eine sehr geringe Menge Koloniematerial mittels der Spitze eines Holzapplikationsstäbchens direkt auf einen Spot der glatten Targetplatte aufgebracht und gleichmäßig innerhalb des Spots verteilt. Dabei wurden für jedes getestete Isolat 12 technische Replikate angefertigt. Anschließend wurden die Proben mit 1 µl Ameisensäure (70 %) durch Auf- und Abpipettieren homogenisiert (Bernhard *et al.*, 2014), bevor sie mit 1 µl CHCA-Matrix überschichtet wurden.

Nach dem Trocknungsprozess wurde die Messung mit dem Autoflex Speed Massenspektrometer (Bruker Daltoniks) nach in Kapitel 3.2.5.2 aufgeführter Methode durchgeführt.

3.2.5.2 Messmethode

Für die Messung mittels MALDI-TOF-MS wurden die in Tabelle 15 aufgeführten Messparameter im linearen positiven Modus in einem Massenbereich von 2–20 kDa angewendet. Zum Erhalt reproduzierbarer Ergebnisse mussten die generierten Spektren nachfolgenden Qualitätsansprüchen entsprechen. Bei einem maximalen Peak Error von 300 ppm waren diese:

- minimale Peak-Auflösung: > 400
- minimales S/N-Verhältnis: 3
- minimale Intensität: 600

Tabelle 15: Verwendete Grundeinstellungen für die Messung der Hefen mit MALDI-TOF-MS

Parameter	Einstellung
Lasereinstellung	
MS/Parent Modus	an
Laseranfangsleistung	40 %, bei Global Offset 20 %
Maximale Laserleistung	50 %
Fuzzy Control, Gewichtung	1,50
Laserschußzahl je Spot	200
Laserbewegung	spiral-klein
Massenbereich	
Evaluierungsbereich	m/z 4000 – 10 000 Da
Prozessierungsmethode	MBT-Process
Minimale Peakauflösung	> 400
Anzahl summierter Spektren	2 000
Baseline Subtraction	an
Smoothing	an
Spektrengenerierung	
MS/Parent Kontrolle	an
Einzelpektren pro 40 Laserschüsse	240
Hochspannung	
Ionenquelle 1	19,50 kV
Ionenquelle 2	18,20 kV
Linse	7,00 kV
linearer Detektor	2877 kV

m/z: Masse-zu-Ladung-Verhältnis; Da: Dalton; kV: Kilo-Volt

3.2.5.3 Nährmedieneinfluss auf die Reproduzierbarkeit der Massenspektren

Im Hinblick auf die in Kapitel 2.3.5 erläuterten Einflüsse des zur Verfügung stehenden Substrates für Hefen während der Anzucht und der daraus resultierenden, veränderlichen Zellwandstabilität, wurde die Reproduzierbarkeit der Massenspektren diesbezüglich im Rahmen der Vorversuche bei insgesamt fünf verschiedenen Nährmedien (CBA, MEA⁺, GYP-Agar, YGC-Agar, SAB-Agar) überprüft.

3.2.5.3.1 Nährmedieneinfluss auf die Massenspektren von *C. albicans* ATCC 10231

Für den ersten Teil des Vorversuchs wurde zunächst die mesophile Hefe *C. albicans* ATCC 10231 verwendet, da für diese Spezies bereits ausreichend geprüfte Daten in der Datenbank der Software Biolyser 3.1.66TM (Bruker Daltoniks) vorhanden waren und dadurch eine valide Interpretation erfolgen konnte. Der Versuch fand an drei Tagen statt, um verschiedene biologische Replikate zu erhalten und die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten. Von den drei biologischen Replikaten wurden jeweils drei Extrakte von einem mit *C. albicans* beimpften CBA, MEA⁺, GYP-Agar, YGC-Agar und SAB-Agar anhand des Standardprotokolls (Kapitel 3.2.5.1.1) angefertigt (Abbildung 12).

Die generierten Massenspektren wurden daraufhin visuell mit Hilfe der Analysesoftware FlexAnalysis 3.4TM (Bruker Daltoniks) auf Basis der Standardeinstellungen und der Software ClinProTools 3.0TM (Bruker Daltoniks) auf mögliche Unterschiede untersucht. Zunächst wurde die Messbarkeit von den jeweiligen Nährmedien durch die Bestimmung der Qualität der übereinandergelegten Massenspektren beurteilt (minimale Peakauflösung > 400, minimales S/N-Verhältnis 2, minimale Intensität 600). Des Weiteren wurden die Massenspektren anhand ihres jeweiligen Erscheinungsbildes (Anzahl Peaks/Intensitäten) verglichen. Bei einer Abweichung des massenspektrometrischen Erscheinungsbildes ermöglichte die angewandte Mehrfachmessung (n=30/Ansatz) eine Überprüfung der Reproduzierbarkeit der Abweichung, wodurch technologisch bedingte Fehler ausgeschlossen werden konnten.

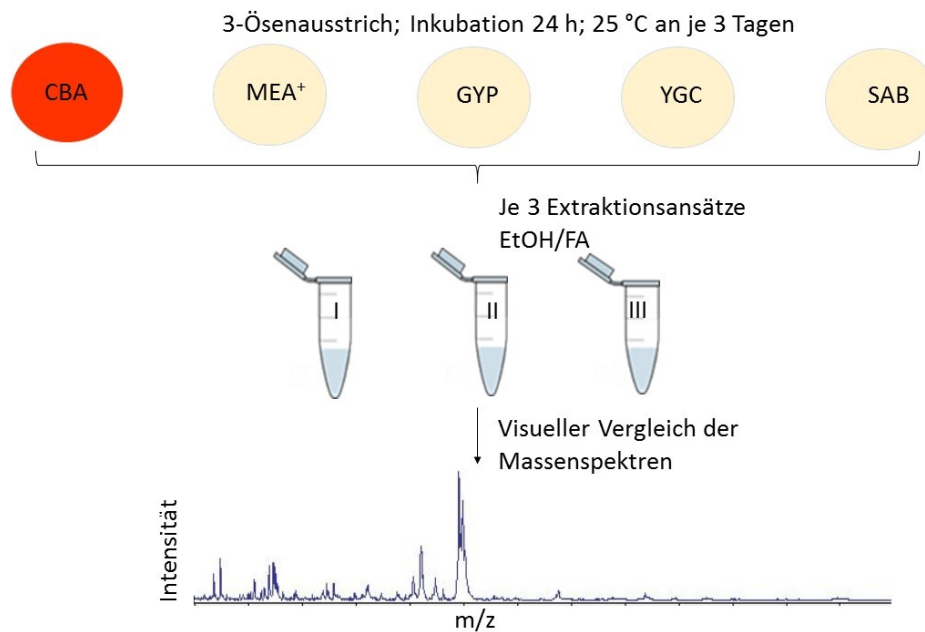


Abbildung 12: Vorgehen für die Überprüfung der Relevanz des verwendeten Nährmediums für die Reproduzierbarkeit der Massenspektren am Beispiel *C. albicans* ATCC 10231. CBA: Columbia-Schafblut-Agar; MEA⁺: Malz-Extrakt-Agar plus Novobiocin; GYP: Glucose-Hefeextrakt-Pepton-Agar; YGC: Hefeextrakt-Glucose-Chloramphenicol-Agar; SAB: Sabouraud-Agar; EtOH: Ethanol (100 %); FA: Ameisensäure (70 %); m/z: Masse-zu-Ladung-Verhältnis

3.2.5.3.2 Nährmedieneinfluss auf die Massenspektren von *K. psychrophila* DSM 26230

Im zweiten Teil des Vorversuchs wurde durch identisches Vorgehen zu den Vorversuchen mit *C. albicans* ATCC 10231 (Kapitel 3.2.5.3.1), der Einfluss des Nährmediums auf die Reproduzierbarkeit der Massenspektren von *K. psychrophila* DSM 26230 überprüft. Im Hinblick auf die Psychrophilie von *K. psychrophila* wurden die Anzuchtbedingungen angepasst, indem die Inkubationstemperatur für diese Hefe auf +10 °C reduziert wurde. Aufgrund der längeren Generationszeit wurde die Inkubationsdauer auf 72 Stunden verlängert (Kabisch *et al.*, 2013; ATCC, 2016). Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte ebenfalls durch den visuellen Vergleich der Spektren mit Hilfe der Software FlexAnalysis 3.4TM (Bruker Daltoniks) und ClinProTools 3.0TM (Bruker Daltoniks).

Für die weitere Untersuchung mittels MALDI-TOF-MS wurde die Anzucht auf SAB-Agar vorgenommen. Die psychrophilen Hefen wurden dafür durch einen Dreiösausschlag überimpft und über 72 Stunden bei +10 °C aerob kultiviert. Zum Erhalt dreier biologischer Replikate wurde der Referenzstamm *K. psychrophila* DSM 26230 im Dreifachansatz auf SAB-Agar überimpft.

Die Referenzstämme *K. unispora* CBS 398, *K. servazzii* CBS 4311 und *K. lodderae* CBS 2757 gehören den mesophilen Spezies an und wurden daher über 48 Stunden bei +25 °C entsprechend der Empfehlung des Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS, Utrecht), ebenfalls in jeweils dreifacher Ausführung auf SAB-Agar aerob inkubiert, bevor sie der Messung mittels MALDI-TOF-MS unterzogen wurden.

3.2.5.4 Extraktion von *K. lodderae* CBS 2757 unter verschiedenen Bedingungen

Mit dem standardmäßigen Proteinextraktionsprotokoll (siehe Kapitel 3.2.5.1.1) war es nicht möglich, ein den Vorgaben entsprechendes Summenspektrum für den Referenzstamm *K. lodderae* CBS 2757 zu erstellen. Da eine sehr stabile Zellwand der Hefe vermutet wurde, wurden das Proteinextraktionsprotokoll sowie die Kultivierungsbedingungen in unterschiedlichen Versuchen modifiziert.

Dazu wurde die Inkubationszeit mit Ameisensäure auf verschiedene Zeitabstände verlängert. Insgesamt wurden dabei drei Ansätze mit jeweils verschiedenen Einwirkzeiten von 10, 12 und 15 Minuten gewählt, während alle anderen Parameter (Kapitel 3.2.5.1), beibehalten wurden (Abbildung 13). Zudem wurden Kultivierungsdauer und –temperatur variiert.

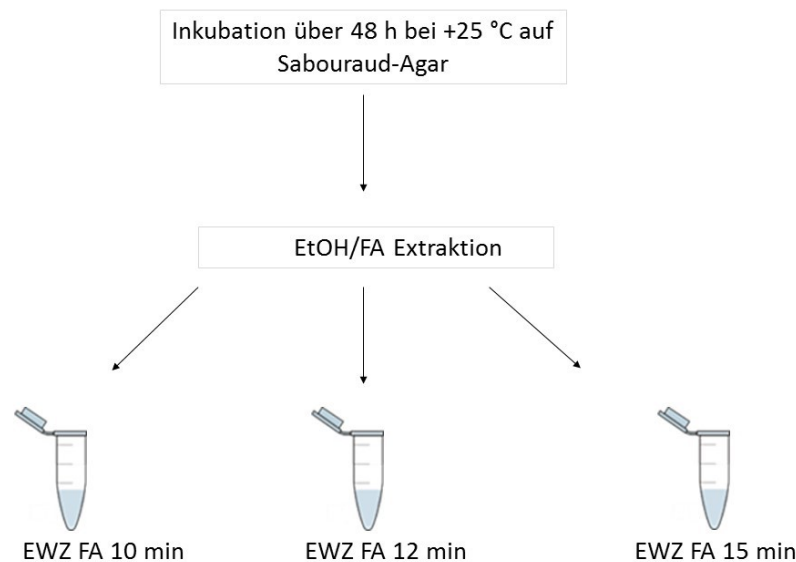


Abbildung 13: Vorgehen bei der Extraktion von *K. lodderae* CBS 2757 mit Ethanol (EtOH) (100 %) und Ameisensäure (FA) (70 %) unter verlängerter Einwirkzeit (EWZ)

In einem weiteren Versuch wurde die Dauer der Anzucht von *K. lodderae* CBS 2757 von 48 Stunden auf 18 und 12 Stunden verkürzt. Als Nährmedium diente SAB-Agar bei einer Kultivierungstemperatur von +25 °C und einer Einwirkzeit der Ameisensäure von 10 Minuten. Parallel wurde eine Subkultur auf MEA⁺ angelegt, um eine Substratabhängigkeit der Zellwandstabilität ausschließen zu können.

Zudem wurde die Kultivierungstemperatur für *K. lodderae* CBS 2757 von +25 °C auf +10 °C reduziert. Die Inkubation erfolgte hierbei über 48 Stunden auf SAB-Agar. Die Extraktion erfolgte nach in Kapitel 3.2.5.1 angegebenem Standardprotokoll zur Proteinextraktion von Hefen.

Die Auswertung der jeweiligen Extraktions- bzw. Kultivierungsverfahren erfolgte durch die visuelle Beurteilung der Spektren mit Hilfe der Software FlexAnalysis 3.4TM (Bruker Daltoniks).

3.2.5.5 Erstellung von Referenzspektren

Da für die untersuchten Wildstämme (Tabelle 7, Kapitel 3.1.1), sowie für die Hefe-Referenzstämme (Tabelle 8, Kapitel 3.1.2), keine korrekte Identifikation mit der verwendeten

kommerziellen Datenbank (Version 3.1.66) von Bruker Daltoniks aufgrund fehlender Referenzdaten möglich war, wurden diese selbst generiert. Insgesamt wurden 26 Referenzspektren erstellt. Davon gehören 24 der Gattung *Kazachstania* an, wobei zunächst das Referenzspektrum (MSP) für *K. psychrophila* DSM 26230 generiert wurde. Zusätzlich wurde ein Referenzspektrum für jeden Wildstamm angefertigt.

Auch für die anderen *Kazachstania*-Referenzstämme (*K. lodderae* CBS 2757, *K. servazzii* CBS 4311, *K. unispora* CBS 398), sowie für die psychrophilen Hefen *M. frigida* DSM 4634 und *M. gelida* DSM 70882, wurden Referenzspektren angefertigt, wobei im Verlauf dieser Studie ein Softwareupdate durch den Hersteller erfolgte, sodass Referenzspektren für *K. lodderae* CBS 2757 und *K. unispora* CBS 2422 und 1543 zur Verfügung gestellt wurden. Die Anzucht und Probenvorbereitung erfolgten gemäß der Beschreibung in Kapitel 3.2.5.1.1.

Die Messmethode (Kapitel 3.2.5.2) wurde vor jeder MSP-Erstellung mit *Escherichia (E.) coli*-Bakterienstandard (Bruker Daltoniks) unter nachfolgend aufgeführten Parametern kalibriert, um dem Anspruch der Vergleichbarkeit der Spektren gerecht zu werden. Der von Bruker Daltoniks empfohlene Bakterienteststandard (BTS) enthält acht Kalibranten im Massenbereich von 3 637,8 bis 16 952,3 Da.

Für ein Referenzspektrum wurden je 10 technische Replikate ($n=30$) von je drei biologischen Replikaten auf ein glattes MALDI MTP 384 Target (Bruker Daltoniks) aufgetragen und vor der Messung mit dem Autoflex Speed Massenspektrometer (Bruker Daltoniks) mit CHCA-Matrix überschichtet. Sofern die Überprüfung der Kalibration als erfolgreich beurteilt werden konnte, wurden von den insgesamt 30 gemessenen Spots mit Hilfe der Software FlexAnalysis 3.4TM (Bruker Daltoniks) mindestens 20 übereinstimmende, den Kriterien entsprechende (min. Peakauflösung > 400, min. S/N-Verhältnis 3, min. Intensität 600) Spektren zu einem Referenzspektrum zusammengefasst. Stark abweichende Spektren (Peakshifts > 500 ppm) oder Nulllinien wurden gelöscht.

Im Anschluss erfolgte ein Abgleich der selbst generierten Spektren mit der Biotyper 3.1.66 OCTM Datenbank (Bruker Daltoniks). Ein Referenzspektrum wurde dann erstellt, wenn durch den Abgleich keine Identifikation (Score Value $\leq 1,699$) möglich war (Anonymous, 2012). Für die qualitative Überprüfung wurden die jeweiligen Organismen mit den Referenzspektren identifiziert, wobei ein zu erreichender Score Value von > 2,3 festgelegt wurde (Stevenson *et al.*, 2010; Wieser *et al.*, 2012; Bader, 2013).

Des Weiteren erfolgte eine Identifikation der Wildstämme anhand des erstellten Referenzspektrums für *K. psychrophila* DSM 26230. Dafür wurden die Hefe-Isolate auf SAB-Agar bei +10 °C über 72 h aerob angezüchtet und mittels der Proteinextraktionsmethode mit Ethanol (100 %) und Ameisensäure (70 %) präpariert. Jedes der erhaltenen Extrakte wurde fünf Mal auf eine glatte MALDI MTP 384 Targetplatte aufgetragen und mit den angegebenen Parametern gemessen. Die Identifikation erfolgte durch den Abgleich der erhaltenen Massenspektren mit dem erstellten Referenzspektrum für *K. psychrophila* DSM 26230 mit Hilfe der Software Biotyper 3.1.66™ (Bruker Daltoniks).

Die richtige Identifikation auf Speziesebene wurde mit einem erreichten Score Value von $\geq 2,300$ gemäß dem Benutzerhandbuch des Herstellers bestimmt (Anonymous, 2012). Außerdem wurde jedes Referenzspektrum einer Spezifitätsprüfung (Kapitel 3.2.5.6) unterzogen, bei der es zu keiner Fehlidentifikation auf Gattungs- und Speziesebene kommen durfte.

3.2.5.6 Spezifitätsprüfung für das Referenzspektrum *K. psychrophila* DSM 26230

Um die Spezifität des Massenspektrums für *K. psychrophila* DSM 26230 auf Speziesebene zu überprüfen, wurde dieses mit der Software Biotyper 3.1.66™ (Bruker Daltoniks) abgeglichen. In der Version 3.1.66 der Datenbank von Bruker Daltoniks befinden sich momentan Referenzdaten folgender *Kazachstania*-Spezies:

- *K. africana* CBS 2517
- *K. bovina* CBS 2760
- *K. exiqua* CBS 135N
- *K. kunashirensis* CBS 7662
- *K. lodderae* CBS 2757
- *K. pintolopesii*
- *K. sinensis*
- *K. slooffiae*
- *K. spencerorum*
- *K. telluris*
- *K. transvaalensis*
- *K. unispora* CBS 2422 und 1543

Da nur wenige (n=12) hinterlegte Spektren für das Genus *Kazachstania* in der aktuellen Version (3.1.66) der Datenbank (Bruker Daltoniks) enthalten sind, wurden weitere MSP's für die Spezies *K. unispora* CBS 398, *K. servazzii* CBS 4311 und *K. lodderae* CBS 2757 gemäß dem Handbuch Biotyper 3.1.66 OC erstellt (Kapitel 2.3.5). Die genannten Referenzstämme wurden als Lyophilisate beim Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS, Utrecht) bezogen und nach den Vorgaben der CBS bei +25 °C auf GYP-Agar kultiviert.

Vor der Extraktion für die massenspektrometrische Messung wurden die Stämme über 48 h auf SAB-Agar bei +25 °C inkubiert. Daraufhin erfolgte die Proteinextraktion mit Ethanol (100 %) und Ameisensäure (70 %) nach in Kapitel 3.2.5.1.1 beschriebener Methode.

Die fertigen Extrakte wurden jeweils 30 Mal auf ein glattes MALDI MTP 384 Target (Bruker Daltoniks) aufgetragen und der Messung mit dem Autoflex Speed Massenspektrometer (Bruker Daltoniks) mit den in Kapitel 3.2.5.2 genannten Einstellungen unterzogen. Die Auswertung der Spektren erfolgte mit dem Softwareprogramm FlexAnalysis 3.4™ (Bruker Daltoniks), wobei Spektren, die nicht den Vorgaben entsprachen (Kapitel 3.2.5.5) gelöscht wurden. Mindestens 20 der aussagekräftigsten Spektren wurden zu einem Referenzspektrum zusammengefasst.

Um die Spezifität der erstellten Referenzspektren bezüglich anderer Genera zu überprüfen, wurden hierfür unterschiedliche Hefe-Isolate aus der Sammlung des Lehrstuhls für Lebensmittelsicherheit ausgewählt und massenspektrometrisch identifiziert. Die Isolate stammen zum einen aus frischem, vakuumverpacktem Rind- oder Lammfleisch, welches im Rahmen einer anderen Forschungsarbeit (Paniora, 2014) untersucht wurden (n=7), zum anderen aus verdorbenen Rindfleischproben (n=13) (Tabelle 9, Kapitel 3.1.1). Um für die Spezifitätsprüfung weitere psychrophile Hefestämme einbeziehen zu können, wurden die psychrophilen Referenzstämme *M. frigida* DSM 4634 und *M. gelida* DSM 70882 ebenfalls miteinbezogen. Die Probenvorbereitung erfolgte mittels dem Proteinextraktionsverfahren mit Ethanol (100 %) und Ameisensäure (70 %) (Kapitel 3.2.5.1.1).

Jeder Extraktionsansatz wurde insgesamt fünf Mal auf ein glattes MALDI MTP 384 Target (Bruker Daltoniks) aufgetragen und mit den in Kapitel 3.2.5.2 genannten Parametern gemessen. Die Identifikation erfolgte wiederum mit der Software Biotyper 3.1.66 OC™ (Bruker Daltoniks).

3.2.5.7 Vergleich der *Kazachstania*-Referenzstämme

Um Aufschluss über die Unterschiede und Ähnlichkeiten der Massenspektren der Referenzstämme *K. psychrophila* DSM 26230, *K. lodderae* CBS 2757, *K. unispora* CBS 398 und *K. servazzii* CBS 4311 zu erhalten, wurden die selbst erstellten Massenspektren, die für die MSP's Verwendung fanden, visuell in der Pseudogeldarstellung des Programmes ClinProTools 3.0™ (Bruker Daltoniks) beurteilt. Dafür wurde eine jeweils gleiche Anzahl an Einzelspektren (n=20) zur Analyse herangezogen. Jedes Spektrum entsprach dabei einem einzeln gemessenen Spot mit je 200 Laserschüssen. Spezifische Massen wurden in der Pseudogeldarstellung als Banden angezeigt, die abhängig von ihrer Intensität schwach (hellblau) bis stark (gelb/rot) abgebildet wurden. Die Anzahl verwendeter Spektren wurde auf der Y-Achse aufgetragen, der Massenbereich entsprach der X-Achse des Diagramms. Der Vergleich der Spektren erfolgte durch die Beurteilung der Gleichmäßigkeit der Intensitäten und der An- oder Abwesenheit von Massen im gleichen Massenbereich.

3.2.5.8 Vergleich der Wildstämme aus frischen und verdorbenen Fleischproben

Um mögliche Unterschiede im Massenspektrum zwischen den Wildstämmen aus verdorbenen Fleischproben und den Isolaten mit Herkunft aus frischen Fleischproben feststellen zu können, wurden jeweils 20 Massenspektren pro Isolat und insgesamt sieben Isolate je Gruppe (verdorbenes Fleisch/nicht verdorbenes Fleisch) visuell in der Pseudogeldarstellung des Statistikprogrammes ClinProTools 3.0™ (Bruker Daltoniks) ausgewertet. Als Vergleichsspektrum diente das Massenspektrum von *K. psychrophila* DSM 26230, von dem ebenfalls 20 Einzelmessungen in das Programm geladen wurden.

4 ERGEBNISSE

4.1 Morphologische Beurteilung

4.1.1 Temperaturabhängiges Wachstum

4.1.1.1 Referenzstämme

Für *K. psychrophila* DSM 26230 konnte die psychrophile Eigenschaft bestätigt werden. Denn nach einer Kultivierung über 48 h bei +4 °C auf Schafblutagar konnte ein beginnendes Wachstum durch nadelstichgroße Einzelkolonien beobachtet werden (Tabelle 16). Bei der Kultivierung bei +10 °C waren im selben Zeitraum (48 h) deutliche Einzelkolonien von teilweise 1 mm Durchmesser erkennbar. Dahingegen konnte bei +20 °C und +25 °C auch nach einem Beobachtungszeitraum von 20 Tagen kein Koloniewachstum festgestellt werden. Die psychrophile Eigenschaft des Referenzstamms *K. psychrophila* DSM 26230 galt damit als bestätigt.

K. lodderae CBS 2757 und *K. unispora* CBS 398 zeigten bei einer Kultivierungstemperatur von +4 °C kein Wachstum (Abbildung 14). Für *K. servazzii* CBS 4311 konnte ein verzögertes Wachstum nach 7 Tagen beobachtet werden, welches sich in nadelstichgroßen Einzelkolonien auf der Blutplatte äußerte.

Für *K. unispora* CBS 398, *K. servazzii* CBS 4311 und *K. lodderae* CBS 2757 konnte der Temperaturbereich von +20 °C bis +25 °C als Optimum bestimmt werden (Abbildung 16 und Abbildung 17), während er für *K. psychrophila* DSM 26230 bei +10 °C lag (Abbildung 15a) (Tabelle 16).

Tabelle 16: Temperaturabhängiges Wachstum der Referenzstämme auf Columbia-Schafblut-Agar (CBA)

Inkubations- zeit	T [°C]	<i>K. psychrophila</i> DSM 26230	<i>K. lodderae</i> CBS 2757	<i>K. servazzii</i> CBS 4311	<i>K. unispora</i> CBS 398
48 h	+4	(+)	-	(+)	-
	+10	(+)	(+)	(+)	(+)
	+20	-	+	+	+
	+25	-	++(+)	+(+)	+(+)
7 d	+4	(+)	-	(+)	-
	+10	++	+	+	+
	+20	-	++	+(+)	++
	+25	-	+++	+(+)	++
14 d	+4	+(+)	-	+	-
	+10	++	++	+(+)	+(+)
	+20	-	++	++	++
	+25	-	+++	+++	+++
20 d	+4	++	-	+	-
	+10	+++	+++	+++	+++
	+20	-	+++	+++	+++
	+25	-	+++	+++	+++

-: kein Wachstum; (+): beginnendes Wachstum; +: wenig Wachstum; ++(+): beginnend mäßiges Wachstum; ++: mäßiges Wachstum; ++(+): starkes Wachstum; +++: sehr starkes Wachstum; K.: *Kazachstania*; DSM: Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen; CBS: Centraalbureau voor Schimmelcultures; h: Stunden; d: Tage; T: Temperatur

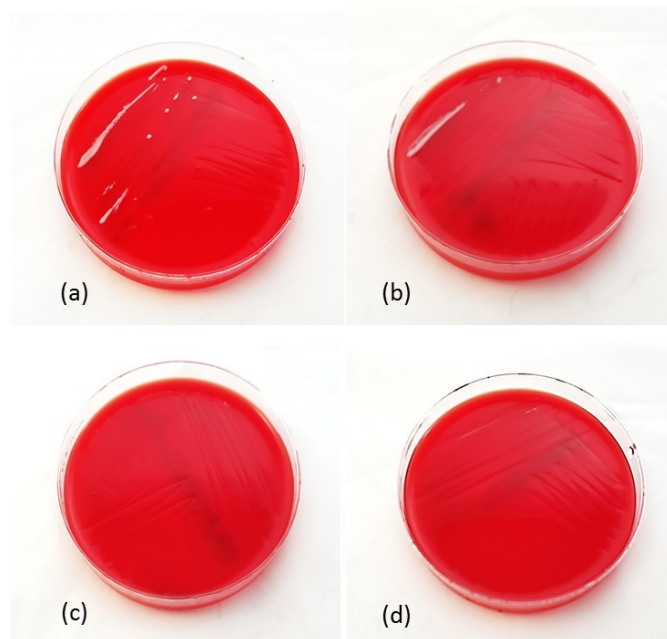


Abbildung 14: Vergleichende Darstellung der *Kazachstania*-Referenzstämme nach aerober Inkubation bei +4 °C auf Columbia-Schafblut-Agar über 14 Tage. (a) *K. psychrophila* DSM 26230; (b) *K. servazzii* CBS 4311; (c) *K. lodderae* CBS 2757; (d) *K. unispora* CBS 398; (c)+(d) zeigen kein Wachstum

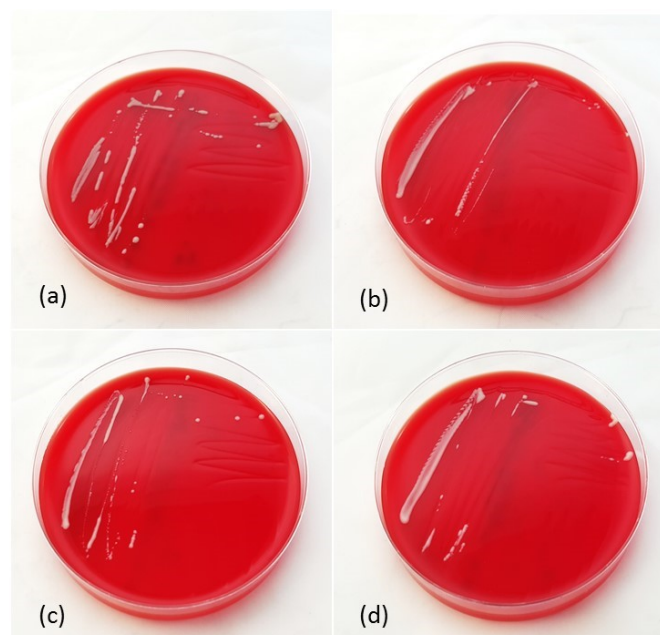


Abbildung 15: Vergleichende Darstellung der *Kazachstania*-Referenzstämme nach aerober Inkubation bei +10 °C auf Columbia-Schafblut-Agar über 14 Tage. (a) *K. psychrophila* DSM 26230; (b) *K. servazzii* CBS 4311; (c) *K. lodderae* CBS 2757; (d) *K. unispora* CBS 398

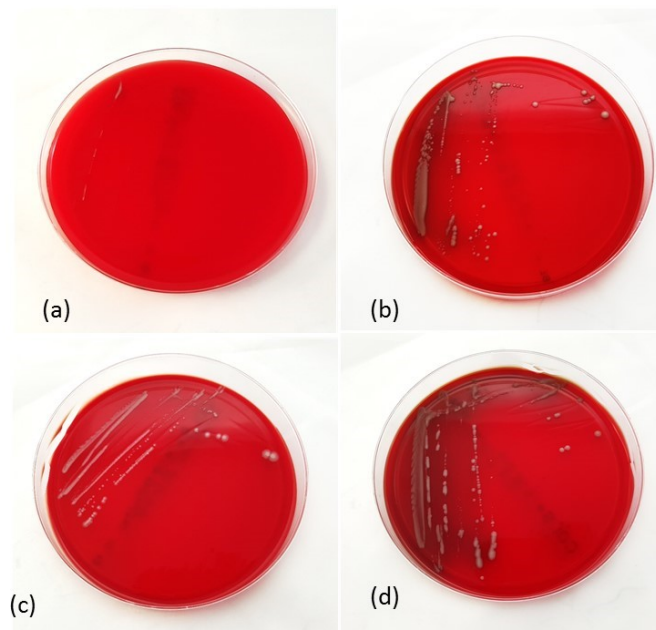


Abbildung 16: Vergleichende Darstellung der *Kazachstania*-Referenzstämme nach aerober Inkubation bei +20 °C auf Columbia-Schafblut-Agar über 14 Tage. (a) *K. psychrophila* DSM 26230 ohne Wachstum; (b) *K. servazzii* CBS 4311; (c) *K. lodderae* CBS 2757; (d) *K. unispora* CBS 398

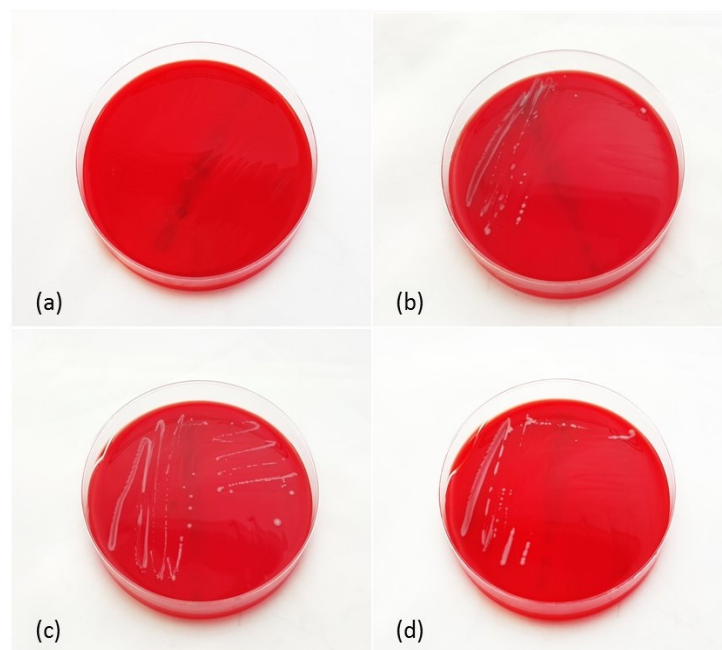


Abbildung 17: Vergleichende Darstellung der *Kazachstania*-Referenzstämme nach aerober Inkubation bei +25 °C auf Columbia-Schafblut-Agar über 14 Tage. (a) *K. psychrophila* DSM 26230 ohne Wachstum; (b) *K. servazzii* CBS 4311; (c) *K. lodderae* CBS 2757; (d) *K. unispora* CBS 398

4.1.1.2 Wildstämme

Von den insgesamt 47 untersuchten Wildstämmen konnte bei 20 Isolaten ein Wachstum im definierten Temperaturbereich zwischen +4 °C und +20 °C beobachtet werden. Deren psychrophile Eigenschaft galt damit als bestätigt. Bei den restlichen 27 Isolaten konnte aufgrund des Wachstums im Bereich von +4 °C bis 25 °C lediglich eine Psychrotoleranz festgestellt werden, weshalb diese Isolate keiner weiteren Untersuchung unterzogen wurden.

Alle psychrophilen Wildstämme (Tabelle 7, Kapitel 3.1.1) zeigten nach durchschnittlich 10 Tagen aerober Inkubation bei +4 °C ein Wachstum auf Blutagar, welches sich in grauweißem Koloniematerial mit glänzender Oberfläche und schleimiger Konsistenz äußerte. Wurden die Isolate bei +10 °C inkubiert, konnte bereits ein Wachstum nach 72 h festgestellt werden. Bei der Inkubation bei +15 °C konnte nach 48 h starkes Koloniewachstum bei allen Isolaten dokumentiert werden, wohingegen bei $\geq +20$ °C kein Wachstum der Isolate zu verzeichnen war. Lediglich bei einem der 20 Isolate (Isolat 16) konnte ein verzögertes Wachstum bei +20 °C beobachtet werden, was sich in nadelstichgroßen Einzelkolonien auf der Blutplatte nach 16 Tagen äußerte. Dieses Isolat zeigte bei +25 °C keinerlei Anzeichen von Vitalität, weshalb es als psychrophil eingestuft wurde.

Auf Basis der genannten Beobachtungen konnte ein Temperaturoptimum für die untersuchten Isolate zwischen +10 °C und +15 °C festgestellt werden, da in diesem Temperaturbereich die größte Vermehrungsfähigkeit in einem Zeitraum von 48 h zu beobachten war, was wiederum deren psychrophile Eigenschaft unterstreicht.

4.1.2 Koloniemorphologische Untersuchung

4.1.2.1 Vergleich der *Kazachstania*-Referenzstämme

Nach aerober Inkubation bei +10 °C auf CBA zeigten die *Kazachstania*-Referenzstämme ein Wachstum durch grau-weißes Koloniematerial mit glänzender Oberfläche und glattem Rand (Abbildung 15, Kapitel 4.1.1.1). Eine phänotypische Unterscheidung konnte dabei nicht getroffen werden. Allerdings bildete *K. lodderae* CBS 2757 nach einer Inkubationszeit von 14 Tagen eisblumenartige Einzelkolonien bei einer Temperatur von +20 °C auf CBA aus (Abbildung 18c), was bei +10 °C und +25 °C nicht beobachtet werden konnte (Abbildung 19). Bei *K. servazzii* CBS 4311 und *K. unispora* CBS 398 fiel nach einer Kultivierung über 14 Tage bei +20 °C eine Vergrünung des CBA auf (Abbildung 16b und d).

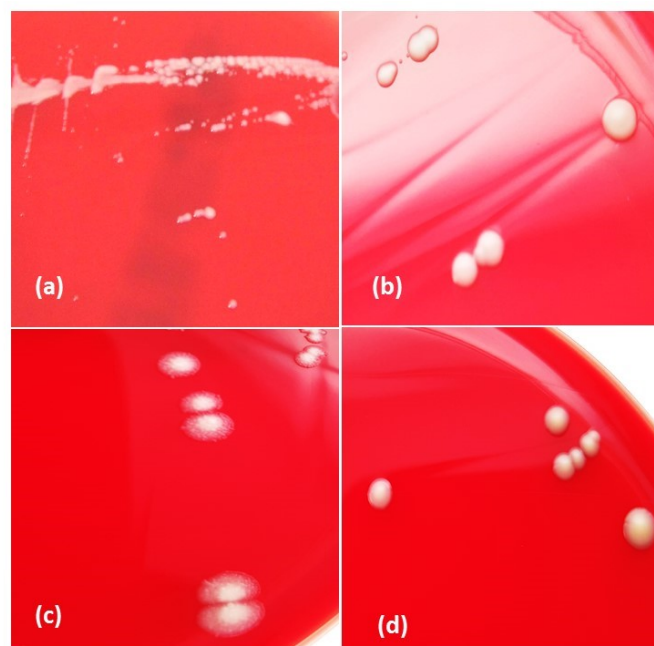


Abbildung 18: Morphologischer Vergleich der Einzelkolonien von (a) *K. psychrophila* DSM 26230; (b) *K. servazzii* CBS 4311; (c) *K. lodderae* CBS 2757 und (d) *K. unispora* CBS 398 nach Kultivierung über 14 Tage bei +20 °C (bzw. +10 °C für *K. psychrophila*) auf Columbia-Schafblut-Agar

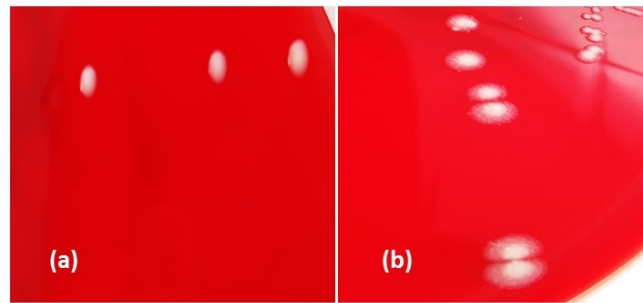


Abbildung 19: Morphologischer Vergleich der Einzelkolonien von *K. lodderae* CBS 2757 nach aerober Kultivierung über 14 Tage bei (a) +10 °C und (b) +20 °C auf Columbia-Schafblut-Agar

Bei der Anzucht auf den hefespezifischen Nährmedien bei +10 °C konnte bei allen *Kazachstania*-Stämmen ein elfenbein- bis cremeweißes Koloniematerial mit glatter und glänzender Oberfläche und ebenso glatten Rändern festgestellt werden. Die Textur war als cremig-weich zu beurteilen. Die Größe der halbkugelförmig erhabenen Einzelkolonien betrug zwischen 1 und 3 mm (Abbildung 20).

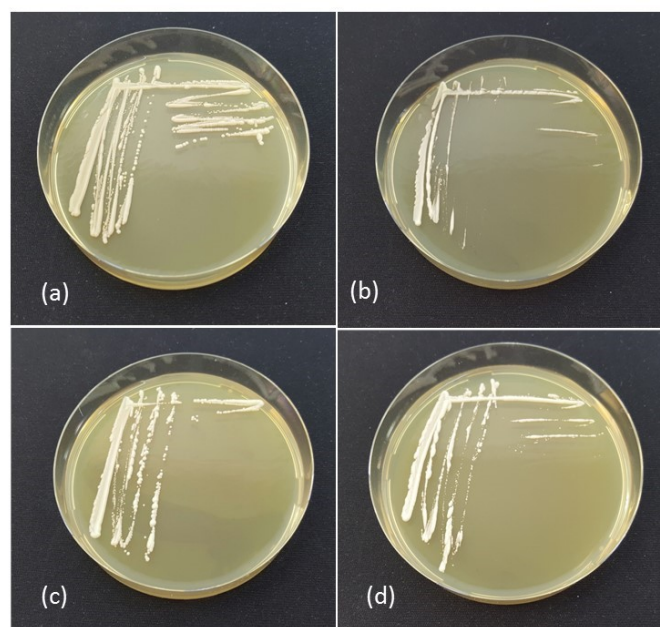


Abbildung 20: Morphologischer Vergleich von (a) *K. psychrophila* DSM 26230; (b) *K. unispora* CBS 398; (c) *K. servazzii* CBS 4311 und (d) *K. lodderae* CBS 2757 nach Kultivierung über 7 Tage bei +10 °C auf Glucose-Hefeextrakt-Pepton-Agar

4.1.2.2 Vergleich der Wildstämme mit *K. psychrophila* DSM 26230

4.1.2.2.1 Columbia-Schafblut-Agar (CBA)

Nach 2 Tagen konnte bei keinem Isolat ein Wachstum beobachtet werden. Auch nach 6 Tagen war bei vier Isolaten (Isolate 2; 12; 13; 17) kein Wachstum erkennbar, zwei Isolate (Isolate 1; 3) zeigten ein beginnendes Wachstum durch nadelstichtartige Einzelkolonien in der ersten Ausstrichfraktion des Nährbodens. Bei elf Isolaten (Isolate 4-9; 10; 11; 15; 16; 20) war ein schwaches Wachstum zu verzeichnen, beim Referenzstamm DSM 26230 und den Isolaten 18 und 19 konnte ein mäßiges Wachstum verzeichnet werden. Bei Isolat 14 bereits ein starkes Wachstum (Tabelle 17).

Bei der Beurteilung nach 14 Tagen war bei Isolat 17 ein beginnendes Wachstum erkennbar, bei der Mehrzahl der Isolate (Isolate 1-10; 12; 13) war ein schwaches Wachstum zu verzeichnen. Beim Referenzstamm *K. psychrophila* DSM 26230 und bei vier Isolaten (Isolate 11; 15; 16; 20) war dagegen ein mäßiges Wachstum zu beobachten. Die Isolate 14, 18 und 19 zeigten starkes Wachstum.

Die morphologische Beschreibung von *K. psychrophila* DSM 26230 und der Wildstämme auf CBA kann überwiegend als grauweiß mit glatter, glänzender Oberfläche erfolgen. Die Isolate 5-8, 14 und 15 bildeten rein weiße Kolonien. Bei einigen Isolaten (Isolate 1-4; 6-8; 11; 15; 19) fiel eine glasig-glänzende Oberfläche auf. Die restlichen Isolate zeichneten sich durch eine glatte glänzende Oberfläche aus. Die Kolonien der Isolate 12, 13 und 17 hatten eine matte Oberfläche. Der Durchmesser der Einzelkolonien betrug 0,5 bis 2 mm mit glattem Rand. Es kam zu keiner Erhebung der Kolonien, sie waren als flach bis verlaufen zu beurteilen.

Die Textur des Referenzstammes DSM 26230 und der Mehrzahl der Wildstämme (Isolate 1-11; 16-20) hatte eine weiche Konsistenz. Bei den Isolaten 12-15 wurde sie als schleimig beurteilt. Sensorisch war bei allen Isolaten ein aromatischer Geruch wahrnehmbar.

Tabelle 17: Übersicht über die morphologischen Eigenschaften des Referenzstamms *K. psychrophila* DSM 26230 und der untersuchten Hefe-Isolate auf CBA nach verschiedenen Inkubationszeiten bei +10 °C

Kriterium	<i>K. psychrophila</i> DSM 26230	Hefe-Isolate (n)
Wachstum nach		
2 d	kein Wachstum	kein Wachstum (20)
6 d	mäßiges Wachstum	kein Wachstum (4) beginnendes Wachstum (2) schwaches Wachstum (11) mäßiges Wachstum (2) starkes Wachstum (1)
14 d	mäßiges Wachstum	beginnendes Wachstum (1) schwaches Wachstum (12) mäßiges Wachstum (4) starkes Wachstum (3)
Farbe	grau-weiß	weiß (6) grau-weiß (14)
Koloniegröße	0,5-1 mm	0,5-2 mm (20)
Oberfläche	glatt, glänzend	glatt, glänzend (7) glasig-glänzend (10) matt glänzend (3)
Beschaffenheit der Ränder	glatt	glatt (20)
Erhebung	flach verlaufen	flach (20)
Textur	weich	weich (16) schleimig (4)
Geruch	aromatisch	aromatisch (20)

K.: *Kazachstania*; n: Anzahl; d: Tage; DSM: Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen

4.1.2.2.2 Malz-Extrakt-Agar plus Novobiocin (MEA⁺)

Bei der morphologischen Beurteilung der untersuchten Wildstämme nach 2 Tagen bei +10 °C auf MEA⁺ konnte bei sieben Isolaten (Isolate 10; 14; 15; 17-20) ein beginnendes Koloniewachstum beobachtet werden, was sich in einem sanften Rasenwachstum äußerte. Bei allen anderen dreizehn Isolaten (Isolate 1-9; 11-13; 16) war nach 2 Tagen noch kein Wachstum erkennbar.

Nach 6 Tagen konnte bei elf Isolaten ein Wachstum der ersten Fraktion der Platte und nach 10 Tagen vorhandene Einzelkolonien in der zweiten Fraktion dokumentiert werden (Isolate 2-9; 12; 13; 20). Lediglich drei Isolate (Isolate 1; 11 und 16) zeigten wenig Koloniewachstum. Sechs Isolate hatten bereits die gesamte Nährbodenplatte besiedelt (Isolate 10; 14; 15; 17-19). Nach 14 Tagen war auf allen der MEA⁺-Nährböden eine starke Koloniebesiedelung zu verzeichnen (Tabelle 18). Die Größe der Einzelkolonien variierte dabei zwischen 1 und 2 mm

mit glattem Rand und ebenmäßiger, glänzender Oberfläche, wobei die Isolate 1, 4 und 17 eine matt glänzende Oberfläche aufwiesen.

Im Vergleich zu *K. psychrophila* DSM 26230 unterschieden sich die einzelnen Hefe-Isolate nur in Nuancen zwischen elfenbeinfarben und cremeweiß (Tabelle 18).

Auch hinsichtlich der Koloniemorphologie wurden feine Unterschiede zu *K. psychrophila* DSM 26230 festgestellt. Für den Referenzstamm DSM 26230 war die Erhebung als flach zu beurteilen. Dies konnte auch für die Isolate 1-4; 10; 12; 16; 17; 19 und 20 beobachtet werden. Die Kolonien der Isolate 6-9; 11; 13-15 und 18 wiesen eine halbkugelartige Form auf. Nur die Einzelkolonien des Isolats 5 zeigten ein kugelförmiges Wachstum. Bei allen inkubierten Platten trat ein mäßig hefiger Geruch auf.

Tabelle 18: Übersicht über die morphologischen Eigenschaften des Referenzstamms *K. psychrophila* DSM 26230 und der untersuchten Hefe-Isolate auf MEA⁺ nach verschiedenen Inkubationszeiten bei +10 °C

Kriterium	<i>K. psychrophila</i> DSM 26230	Hefe-Isolate (n)
Wachstum nach		
2 d	kein Wachstum	kein Wachstum (13) nadelstichartig (7)
6 d	starkes Wachstum	wenig Wachstum (3) mäßiges Wachstum (11) starkes Wachstum (6)
14 d	starkes Wachstum	starkes Wachstum (20)
Farbe	elfenbeinfarben	elfenbeinfarben (10) cremeweiß (7) gelblich weiß (1) zitronenfleischig (1) grauweiß (1)
Koloniegröße	1 mm	1 – 2 mm (20)
Oberfläche	glatt, glänzend	glatt, glänzend (16) matt glänzend (4)
Beschaffenheit der Ränder	glatt	glatt (20)
Erhebung	flach	flach (10) halbkugelförmig (9) kugelförmig (1)
Textur	cremig weich	cremig weich (13) schleimig (6) buttrig (1)
Geruch	mäßig hefig	mäßig hefig (20)

K.: *Kazachstania*; n: Anzahl; d: Tage; DSM: Deutsche Stammsammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen

4.1.2.2.3 Glucose-Hefeextrakt-Pepton-Agar (GYP-Agar)

Auf GYP-Agar zeigte sich bei der Hälfte der Isolate bereits nach einer Inkubationszeit von 2 Tagen bei +10 °C ein beginnendes Koloniewachstum. In der Mehrzahl war das morphologische Erscheinungsbild in Analogie zum Referenzstamm *K. psychrophila* DSM 26230 von elfenbeinfarbenem Koloniematerial mit glatter oder matt glänzender Oberfläche und flachen bis halbkugelförmigen Einzelkolonien mit glattem Rand geprägt (Abbildung 21).

Die Isolate 4 und 13 zeigten eine geringgradige Lappung der Kolonieränder (Abbildung 22a), die nach einem Inkubationszeitraum von 8 Wochen in ihrer Ausprägung zunahm (Abbildung 22b).

Die Oberfläche eines Isolats (Isolat 13) erschien im Gegensatz zu den anderen Isolaten trocken, während sich je zwei Isolate (Isolate 12; 19) durch eine perlmuttartig glänzende bzw. glasig-glänzende (Isolate 6; 7) Oberfläche unterschieden.

Die Größe der Einzelkolonien variierte zwischen 0,5 mm und 2 mm, wobei bei drei Isolaten (Isolate 2; 3; 19) nach über 14 Tagen eine Koloniegröße von bis zu 3 mm festgestellt werden konnte (Tabelle 19). Die Textur war als weich bis buttrig zu beschreiben, wobei bei Isolat 4 eine weiche, fadenziehende Konsistenz festgestellt werden konnte. Von Isolat 6 ging kein merklicher Geruch nach Hefe aus, wohingegen bei den anderen Isolaten ein leichter bis mäßig starker Hefegeruch wahrnehmbar war.

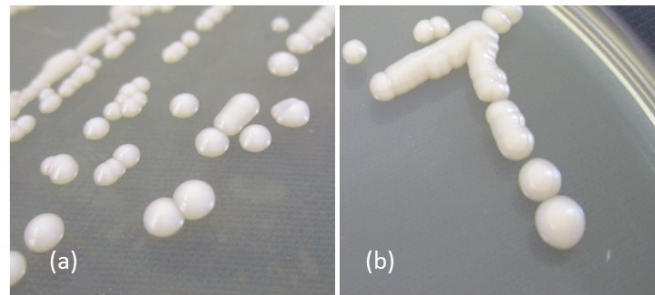


Abbildung 21: (a) *K. psychrophila* DSM 26230 und (b) Isolat 2 nach 10 Tagen Inkubation auf Glucose-Hefeextrakt-Pepton-Agar bei +10 °C: elfenbeinfarbene Einzelkolonien mit glänzender, glatter Oberfläche und glattem Rand

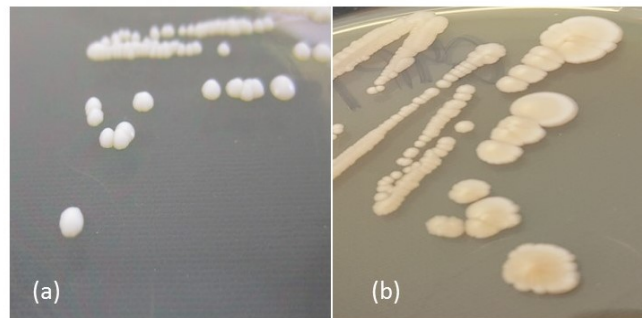


Abbildung 22: (a) Isolat 4 nach 10 Tagen Inkubation auf Glucose-Hefeextrakt-Pepton-Agar bei +10 °C: cremefarbene Einzelkolonien mit matt glänzender Oberfläche und geringgradig gelapptem Rand und (b) Isolat 4 nach 8 Wochen Inkubation; große, cremefarbene Einzelkolonien mit zentraler Erhebung und deutlich gelapptem Rand

Tabelle 19: Übersicht über die morphologischen Eigenschaften des Referenzstamms *K. psychrophila* DSM 26230 und der untersuchten Hefe-Isolate auf GYP-Agar nach verschiedenen Inkubationszeiten bei +10 °C

Kriterium	<i>K. psychrophila</i> DSM 26230	Hefe-Isolate (n)
Wachstum nach		
2 d	kein Wachstum	beginnendes Wachstum (10) kein Wachstum (10)
6 d	mäßiges Wachstum	wenig Wachstum (2) mäßiges Wachstum (14) starkes Wachstum (4)
14 d	starkes Wachstum	mäßiges Wachstum (3) starkes Wachstum (17)
Farbe	elfenbeinfarben	elfenbeinfarben (9) cremeweiß (11)
Koloniegröße	0,5-1 mm	0,5-2 mm (17) bis zu 3 mm (3)
Oberfläche	matt, glänzend	glatt, glänzend (6) glasig glänzend (2) perlmutterartig glänzend (2) matt glänzend (9) matt, trocken (1)
Beschaffenheit der Ränder	glatt	glatt (18) gelappt (2)
Erhebung	flach	flach (11) halbkugelförmig (8) kugelförmig (1)
Textur	cremig	weich, cremig (17) buttrig (2) fadenziehend (1)
Geruch	mäßig hefig	kein Hefegeruch (1) schwach hefig (5) mäßig hefig (10) stark hefig (4)

K.: *Kazachstania*; n: Anzahl; d: Tage; DSM: Deutsche Stammsammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen

4.1.2.2.4 Hefeextrakt-Glucose-Chloramphenicol-Agar (YGC-Agar)

Ein Koloniewachstum auf YGC-Agar war bereits nach 2 Tagen bei +10 °C bei vier der zwanzig psychophilen Isolate (Isolate 17-20) erkennbar. Nach 6 Tagen war bei sechs Isolaten (Isolat 1; 5; 6; 10; 16 und 19) wenig Wachstum erkennbar. Bei zwölf Isolaten war ein mäßiges Wachstum zu verzeichnen und ein Isolat (Isolat 10) zeigte auch nach über 14 Tagen nur wenig Wachstum auf YGC-Agar (Tabelle 20).

Die überwiegend elfenbeinfarbenen Kolonien in Analogie zum Referenzstamm DSM 26230 wiesen eine Größe von 1 bis 2 mm mit glatter, glänzender Oberfläche und glattem Rand auf (Abbildung 23a und b). Sechs Isolate (Isolate 6; 9; 14-16; 19) erschienen perlmuttartig und Isolat 4 erschien weiß mit matt glänzender Oberfläche und leicht gelappten Rändern. Eine kugelförmige Erhebung war bei den Isolaten 2, 3 und 19 erkennbar. Die Isolate 5, 11, 13, 16-18 und 20 bildeten halbkugelförmige Einzelkolonien.

Isolate 7 und 10 wiesen, abweichend von der Mehrzahl mit cremiger Textur, eine schleimige Konsistenz auf. Bei Isolat 5 konnte eine leicht fadenziehende Textur festgestellt werden. Bei zwei Isolaten (Isolat 16 und 19) war ein starker Hefegeruch wahrnehmbar.

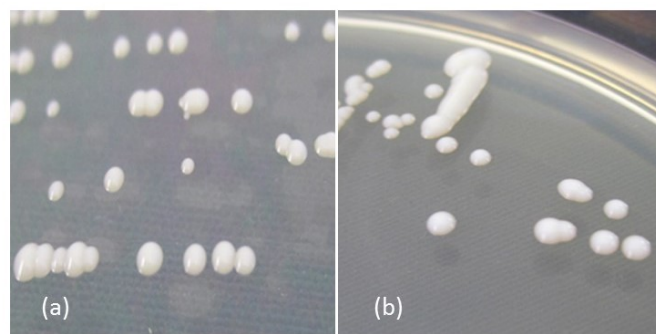


Abbildung 23: (a) *K. psychrophila* DSM 26230 und (b) Isolat 20 nach 10 Tagen Inkubation auf Hefeextrakt-Glucose-Chloramphenicol-Agar bei +10 °C: elfenbeinfarbene Einzelkolonien mit glattem Rand und glatter, glänzender Oberfläche

Tabelle 20: Übersicht über die morphologischen Eigenschaften des Referenzstamms *K. psychrophila* DSM 26230 und der untersuchten Hefe-Isolate auf YGC-Agar nach verschiedenen Inkubationszeiten bei +10 °C

Kriterium	<i>K. psychrophila</i> DSM 26230	Hefe-Isolate (n)
Wachstum nach		
2 d	kein Wachstum	kein Wachstum (16) beginnendes Wachstum (4)
6 d	mäßiges Wachstum	wenig Wachstum (6) mäßiges Wachstum (12) starkes Wachstum (2)
14 d	starkes Wachstum	wenig Wachstum (1) mäßiges Wachstum (3) starkes Wachstum (16)
Farbe	elfenbeinfarben	weiß (1) perlweiß (1) elfenbeinfarben (17) cremeweiß (1)
Koloniegröße	1 mm	1-2 mm (20)
Oberfläche	glatt, glänzend	glatt, glänzend (13) perlmutterartig glänzend (6) matt glänzend (1)
Beschaffenheit der Ränder	glatt	glatt (19) gelappt (1)
Erhebung	flach	flach (10) halbkugelförmig (7) kugelförmig (3)
Textur	weich, leicht fadenziehend	cremig weich (16) schleimig (2) buttrig (1) buttrig, leicht fadenziehend (1)
Geruch	leicht hefig	leicht hefig (4) mäßig hefig (14) stark hefig (2)

K.: *Kazachstania*; n: Anzahl; d: Tage; DSM: Deutsche Stammsammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen

4.1.2.2.5 Sabouraud-Agar (SAB-Agar)

Auf SAB-Agar zeichnete sich bei acht von zwanzig Isolaten ein Wachstumsbeginn innerhalb von 2 Tagen ab (Isolate 10; 14-20). Nach 6 Tagen zeigten alle Isolate ein mäßig starkes Wachstum und nach 14 Tagen war bei allen Isolaten die gesamte Nährbodenplatte besiedelt (Tabelle 21).

Bei der koloniemorphologischen Beurteilung nach > 14 Tagen konnten zwei Gruppen gebildet werden. Bei allen Isolaten, mit Ausnahme von Isolat 4, fiel eine braune Verdunkelung im Zentrum der Einzelkolonien auf, wobei eine Gruppe (1) Einzelkolonien mit glattem Rand

aufwies (Abbildung 24a und b), während die andere (Gruppe 2), bestehend aus den Isolaten 4 und 17, Einzelkolonien mit gelapptem Rand zeigte (Abbildung 26a und b). Diese Lappung trat allerdings erst nach einem Inkubationszeitraum von 8 Wochen auf und konnte nach 14 Tagen noch nicht abgeleitet werden (Abbildung 25a und b).

Isolat 4 wies auf SAB-Agar im Vergleich zu den anderen Isolaten und zum Referenzstamm DSM 26230 ein elfenbeinweißes Koloniewachstum mit matter Oberfläche und kugelförmigen Einzelkolonien auf (Abbildung 25a). Der Referenzstamm *K. psychrophila* DSM 26230 verhielt sich diesbezüglich analog zu Gruppe 1 (Abbildung 24a).

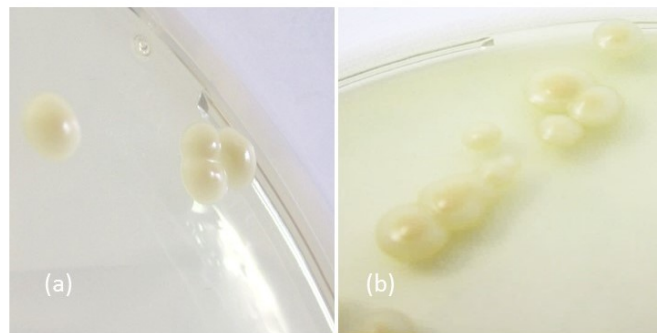


Abbildung 24: (a) *K. psychrophila* DSM 26230 und (b) Isolat 14 nach 14 Tagen aerober Inkubation auf Sabouraud-Agar bei +10 °C: spiegeleiähnliche Einzelkolonien mit glänzender Oberfläche und glattem Rand

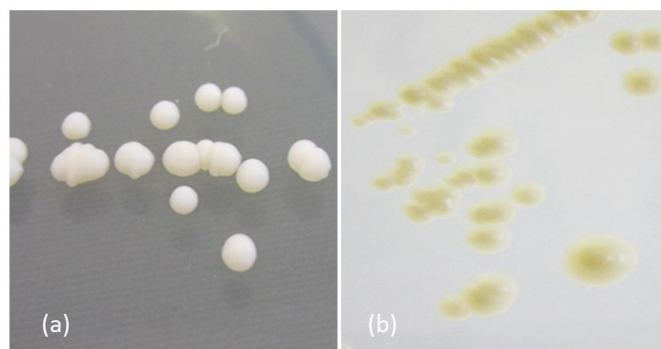


Abbildung 25: Isolat 4 und Isolat 17 nach 14 Tagen aerober Inkubation auf Sabouraud-Agar bei +10 °C: (a) Isolat 4 mit elfenbeinfarbenen kugelförmigen Einzelkolonien; (b) Isolat 17 mit spiegeleiähnlichen Einzelkolonien und glattem Rand

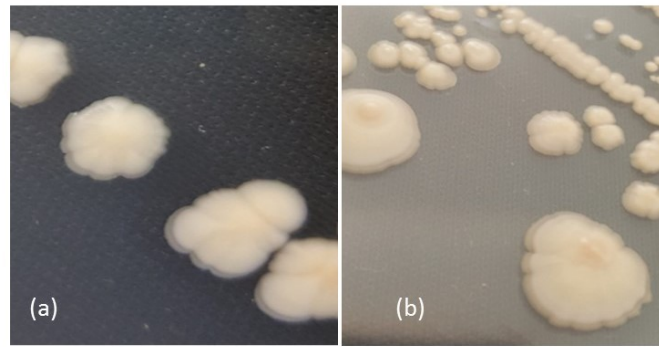


Abbildung 26: (a) Isolat 4 und (b) Isolat 17 nach 8 Wochen aerober Inkubation auf Sabouraud-Agar bei +10 °C: spiegeleiähnliche Kolonien mit gelappten Rändern bei beiden Isolaten

Tabelle 21: Übersicht über die morphologischen Eigenschaften des Referenzstamms *K. psychrophila* DSM 26230 und der untersuchten Hefe-Isolate auf Sabouraud-Agar nach verschiedenen Inkubationszeiten bei +10 °C

Kriterium	<i>K. psychrophila</i> DSM 26230	Hefe-Isolate (n)
Wachstum nach		
2 d	wenig Wachstum	kein Wachstum (12) wenig Wachstum (8)
6 d	mäßiges Wachstum	mäßiges Wachstum (20)
14 d	starkes Wachstum	starkes Wachstum (20)
Farbe	hellbeige mit zentraler Verdunkelung	gelblich weiß (1) elfenbeinfarben (5) cremeweiß (14)
Koloniegröße	2 mm	1-2 mm (19) bis zu 4 mm (1)
Oberfläche	perlmutterartig glänzend	glatt, glänzend (13) perlmutterartig glänzend (2) matt glänzend (3) matt (2)
Beschaffenheit der Ränder	glatt	glatt (18) gelappt (2)
Erhebung	flach	flach (16) halbkugelförmig (1) kugelförmig (2)
Textur	buttrig, weich	wassertropfenartig (1) cremig weich (16) schleimig-flüssig (1)
Geruch	leicht hefig	buttrig weich (3) leicht hefig (3) mäßig hefig (8) stark hefig (9)

K.: *Kazachstania*; n: Anzahl; d: Tage; DSM: Deutsche Stammsammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen

4.1.3 Lichtmikroskopische Untersuchung

4.1.3.1 Untersuchung im Nativpräparat

4.1.3.1.1 Referenzstamm *K. psychrophila* DSM 26230

In der lichtmikroskopischen Untersuchung ergab sich für den Referenzstamm *K. psychrophila* DSM 26230, analog zu der Beschreibung durch Kabisch *et al.* (2013), eine rund-ovale Zellform mit Hefezellen in einer Größe zwischen 3 und 4 μm (Abbildung 27a) und der Ausbildung von mehreren Ascosporen innerhalb einer Zelle (Abbildung 27b). Auf YGC- und SAB-Agar konnte die Ausbildung von birnenförmigen Zellen beobachtet werden (Abbildung 27c). Die in der Literatur beschriebene Ausbildung von Pseudohyphen konnte beim Wachstum auf den verschiedenen Nährböden beim Referenzstamm DSM 26230 nicht festgestellt werden.

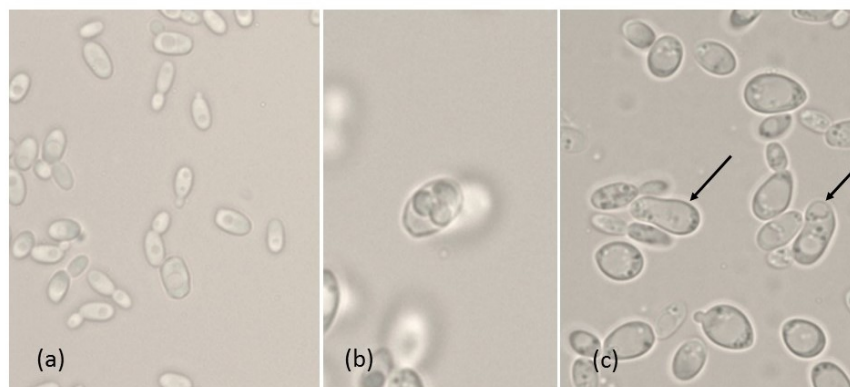


Abbildung 27: (a) Lichtmikroskopische Darstellung von *K. psychrophila* DSM 26230 nach 7 Tagen auf Malz-Extrakt-Agar⁺ bei +10 °C (Nativpräparat, 100fache Vergrößerung); (b) Ascus mit 3 Ascosporen nach 14 Tagen Kultivierung auf Malz-Extrakt-Agar⁺ bei +10 °C (Nativpräparat, Zoom-Ansicht in 100facher Vergrößerung); (c) birnenförmige Zellen auf Sabouraud-Agar nach 10 Tagen bei +10 °C (schwarze Pfeile) (Nativpräparat, Zoom-Ansicht in 100facher Vergrößerung)

4.1.3.1.2 Vergleich der *Kazachstania*-Referenzstämme

Durch die lichtmikroskopische Untersuchung im Nativpräparat war eine Unterscheidung bezüglich der Zellformen und der Anzahl der Ascosporen von *K. psychrophila* DSM 26230 zu anderen *Kazachstania* spp. möglich.

Hefezellen von *K. psychrophila* DSM 26230 stellten sich als vorwiegend ovale bis ellipsoide Zellen dar (Abbildung 28a), während für *K. lodderae* CBS 2757 runde Zellen mit teilweise mehr als acht kreisrunden Ascosporen charakteristisch waren (Abbildung 28b).

K. unispora CBS 398 zeichnete sich durch eine rund-ovale Zellform mit einem Ascosporus aus (Abbildung 28c). Bei *K. servazzii* CBS 4311 konnte vereinzelt eine ungeschlechtliche Vermehrung durch bipolare Knospung festgestellt werden (Abbildung 28d). Bezüglich der zur Verfügung stehenden Substrate durch die verschiedenen Nährmedien konnten keine Unterschiede in der Zellmorphologie beobachtet werden.

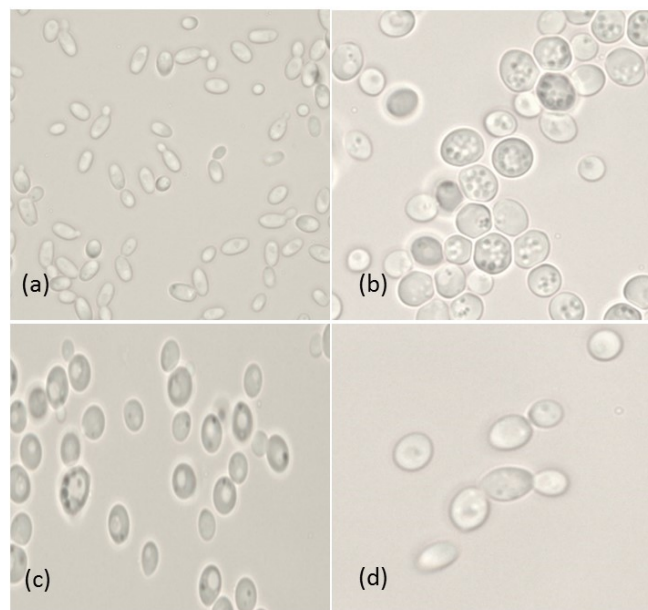


Abbildung 28: Lichtmikroskopische Gegenüberstellung der *Kazachstania*-Referenzstämme nach aerober Anzucht auf Hefeextrakt-Glucose-Chloramphenicol-Agar bei +10 °C für 7 Tage: (a) *K. psychrophila* DSM 26230; (b) *K. lodderae* CBS 2757; (c) *K. unispora* CBS 398; (d) *K. servazzii* CBS 4311 (b: Zoom-Ansicht in 100facher Vergrößerung; a, c+d: 100fache Vergrößerung)

4.1.3.1.3 Wildstämme

Bei der lichtmikroskopischen Untersuchung der Wildstämme ergab sich ein überwiegendes Bild von rund-ovalen Zellformen in einer Größe von 3-4 µm. Während sich die Isolate auf Schafblutagar in einheitlich rund-ovaler Form darstellten, konnte bei Isolat 6 dasselbe Sporulationsverhalten, ähnlich zum Referenzstamm DSM 26230 auf MEA⁺, beobachtet werden (Abbildung 29a, schwarze Pfeile).

Auf MEA⁺ fiel das Isolat 5 durch einige zitronenförmige Zellen auf und die Isolate 8; 10 und 15 bildeten teils birnenförmige Zellen unter den sonst rund-ovalen. Die Isolate 4 und 9 wiesen die höchste Diversität auf. Sie bildeten im Gegensatz zu den anderen Isolaten auf allen Nährbodenarten birnenförmige und teilweise elongierte Zellformen aus (Abbildung 30a und b). Zwei Isolate (Isolate 2; 9) wiesen auf GYP-Agar zitronenförmige Zellen auf. Auf SAB-Agar bildeten die Isolate 4 und 15 in Analogie zum Referenzstamm DSM 26230 birnenförmige Zellen, Isolat 9 und 6 wuchsen zitronenförmig (Abbildung 29b). Auf YGC-Agar waren bei den Isolaten 5, 9 und 13, sowie beim Referenzstamm DSM 26230 birnenförmige Zellen zu sehen. Bei den Isolaten 8 und 12 fielen häufiger Kartoffelformen auf.

Die Vermehrung erfolgt dementsprechend bei allen Isolaten teils ungeschlechtlich durch unipolare Knospung (Budding), teils geschlechtlich durch Ascosporenbildung. Bei Isolat 10 konnte auf MEA⁺ oftmals eine bipolare Knospung festgestellt werden. Durch die lichtmikroskopische Untersuchung wurden die Wildstämme der Familie der *Ascomycetaceae* zugeordnet.

Pseudohyphen konnten bei einzelnen Isolaten (Isolate 4, 5, 7, 9 und 10) bei der Anzucht auf MEA⁺ beobachtet werden (Abbildung 30b und Abbildung 31).

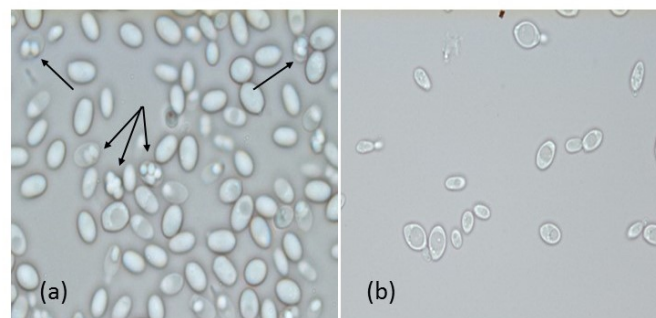


Abbildung 29: (a) Schwarze Pfeile: multiple Ascosporation in mehreren Hefezellen (Isolat 6) auf Schafblutagar (b) anamorphe Stadien (unipolare Knospung) der überwiegend zitronenförmigen Hefezellen (Isolat 6) auf Sabouraud-Agar nach 7 Tagen Inkubation bei +10 °C (Nativpräparat, 100fache Vergrößerung)

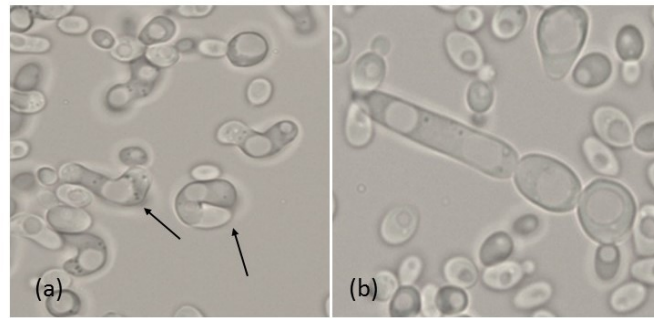


Abbildung 30: (a) Vereinzelte hufeisenförmige Zellen des Isolats 4 (schwarze Pfeile, Nativpräparat, 100fache Vergrößerung); (b) elongierte Zellform von Isolat 4 auf Malz-Extrakt-Agar⁺ nach 7 Tagen Inkubation bei +10 °C (Nativpräparat, Zoom-Ansicht in 100facher Vergrößerung)

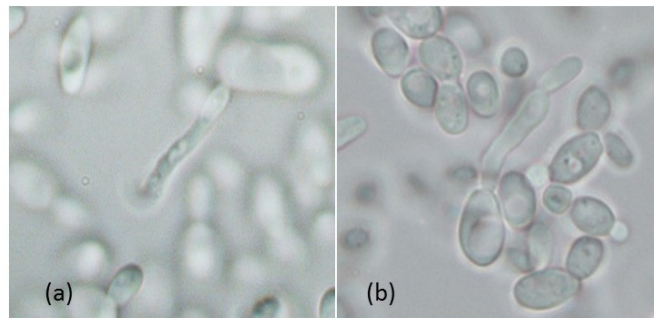


Abbildung 31: (a) Pseudohyphenbildung bei Isolat 5 und (b) Isolat 9 auf Malz-Extrakt-Agar⁺ nach Inkubation bei +10 °C über 7 Tage (Nativpräparat, Zoom-Ansicht in 100facher Vergrößerung)

4.1.3.2 Färbung nach Gram

Im Grampräparat stellte sich die Polnarbe, die in Folge der unipolaren Knospung zurückbleibt, teilweise als Gram-negativ dar (Abbildung 32b, schwarzer Pfeil).

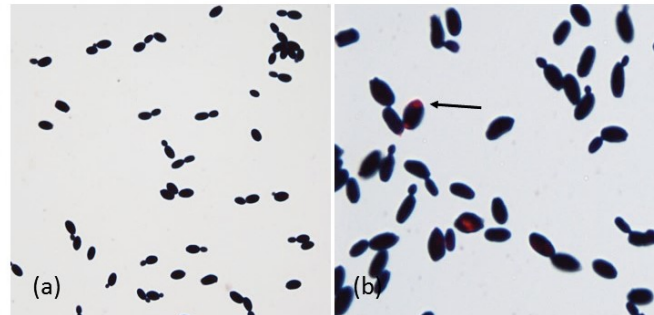


Abbildung 32: (a) Unipolare Knospung bei Isolat 17 nach 8 Tagen Kultivierung auf Malz-Extrakt-Agar⁺ bei +10 °C (Gram-Präparat, 40fache Vergrößerung); (b) Isolat 16: rund-ovale Hefezellen mit Gram-negativer Polnarbe (schwarzer Pfeil) (Gram-Präparat, 100fache Vergrößerung)

Abbildung 33 zeigt Isolat 7 nach Kultivierung über 8 Tage auf Malz-Extrakt-Agar plus Novobiocin (MEA⁺) im Gram-Präparat mit deutlicher Pseudohyphenbildung.

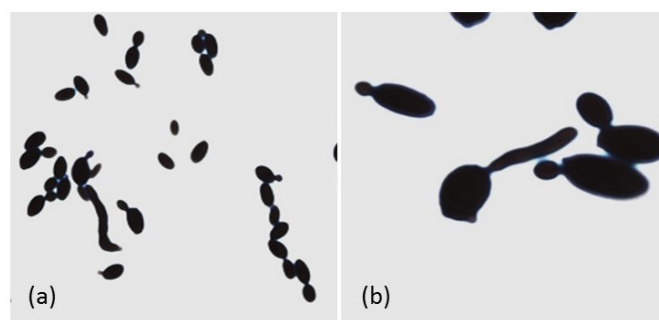


Abbildung 33: (a) und (b) Deutliche Pseudohyphenbildung bei Isolat 7 nach 8 Tagen bei +10 °C auf Malz-Extrakt-Agar⁺ (MEA⁺) (a) Gram-Präparat, 40fache Vergrößerung; (b) Gram-Präparat, Zoomausschnitt aus 100facher Vergrößerung

4.2 Biochemische Untersuchung

4.2.1 API 20 C AUX® und API Candida®

Die Auswertung der Testergebnisse für den API 20 C AUX® und API Candida® nach einer Inkubation über 72 h bei +10 °C ergab in den meisten Fällen ein uneindeutiges Ergebnis durch eine nur sehr geringgradige Trübung des Ergebnisfeldes. Bei der Beurteilung der Ergebnisse durch die Software API Biomérieux™ ergaben sich in allen Fällen zweifelhafte Ergebnisse. Als Schlussfolgerung wurde für die weitere Untersuchung der biochemischen Eigenschaften der Wildstämme ein anderes Testsystem verwendet (Kapitel 3.2.3).

4.2.2 Zuckerreaktionstests

Bei der Auswertung der Zuckerreaktionsröhrchen der Firma Liofilchem (Roseto degli Abruzzi, Italien) kam es bei einem positiven Ergebnis zu einem Farbumschlag von lila nach gelb. In den meisten Fällen konnte dieser Farbumschlag als eindeutig beurteilt werden. Nur bei 5 Reaktionen wurde ein schwach positives Ergebnis ermittelt (Tabelle 22).

Tabelle 22: Biochemisches Profil der untersuchten Wildstämme im Vergleich zu *K. psychrophila* DSM 26230

Zuckerart	<i>K. psychrophila</i> DSM 26230		Wildstämme (n)		
	Literatur	Eigene Untersuchung	positiv	schwach positiv	negativ
Adonitol	k.A.	-	0	0	20
Arabinose	k.A.	-	0	0	20
Arabitol	k.A.	-	0	0	20
Dulcitol	k.A.	-	0	0	20
Galactose	k.A.	+	17	1	2
Glucose	+	+	20	0	0
Inositol	k.A.	-	0	0	20
Inulin	k.A.	-	0	0	20
Lactose	k.A.	-	0	0	20
Levulose	k.A.	+	20	0	0
Maltose	s/l	-	0	0	20
Mannitol	k.A.	-	0	0	20
Mannose	k.A.	+	20	0	0
Trehalose	+	+	16	3	1
Raffinose	A.+	-	3	3	14
Rhamnose	k.A.	-	0	0	20
Salicin	k.A.	-	0	0	20
Sucrose	A.;+	+	18	0	2
Sorbitol	k.A.	-	0	0	20
D-Xylose	k.A.	-	1	0	19

A.: Assimilation; K.: *Kazachstania*; +: positiv; -: negativ; n: Anzahl; s/l: schwach/langsam; k.A.: keine Angabe; DSM: Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen

Für die Mehrzahl der Wildstämme ergab sich ein ähnliches biochemisches Profil, wie für den Referenzstamm DSM 26230. Während Glucose von allen Isolaten verstoffwechselt werden konnte, waren die Ergebnisse für Galactose bei zwei Isolaten (Isolate 12 und 13) negativ und bei Isolat 4 schwach positiv. Dabei hatte ein Farbumschlag stattgefunden, wobei die Farbe jedoch nicht eindeutig als gelb zu definieren war.

Bei der Fermentation von Sucrose war das Ergebnis bei zwei Isolaten (Isolate 18 und 20) als negativ zu bewerten. Eine Fermentation von Mannose und Levulose fand bei allen Isolaten statt.

Für α -Trehalose fand bei drei Isolaten (Isolate 16; 17; 19) nur ein schwacher Farbumschlag statt. Bei Isolat 20 war kein Farbumschlag festzustellen. Bei den anderen Isolaten war eine Positivreaktion erkennbar.

Entgegen der Literaturangaben (Kabisch *et al.*, 2013) konnte in den eigenen Untersuchungen bei *K. psychrophila* DSM 26230 keine Positivreaktion bei der Fermentation von Maltose festgestellt werden. Dies zeigte sich auch bei den Wildstämmen.

Drei der Isolate (Isolate 7; 8; 9) zeigten eine schwach positive Reaktion für Raffinose und drei reagierten eindeutig positiv (Isolate 5; 6; 19). Eine Reaktion für D-Xylose fand nur bei Isolat 5 statt. Alle anderen durchgeführten Zuckertests fielen negativ aus.

Auf Basis der oben ausgeführten Testergebnisse und mit Hilfe des Programms Bionumerics 7.5TM (AppliedMath) konnte eine Einteilung der Isolate in insgesamt 7 Gruppen (Gruppen A-G) erfolgen (Abbildung 34). Gruppe A umfasste alle Isolate, die sich biochemisch identisch zum Referenzstamm *K. psychrophila* DSM 26230 verhielten. Isolat 4 unterschied sich zum Referenzstamm nur durch eine verzögerte Reaktion des Galactosetests und die Isolate 16 und 17 durch eine langsame Reaktion bei α -Trehalose. Da sich ansonsten ein gleiches biochemisches Profil zum Referenzstamm DSM 26230 ergab, wurden diese Isolate ebenfalls der Gruppe A zugeteilt (Abbildung 34). Eine Beziehung zwischen den biochemischen Eigenschaften und der Herkunft aus frischen (Isolate 14-20) und aus verdorbenen Fleischproben (Isolate 1-13) konnte nicht hergestellt werden.

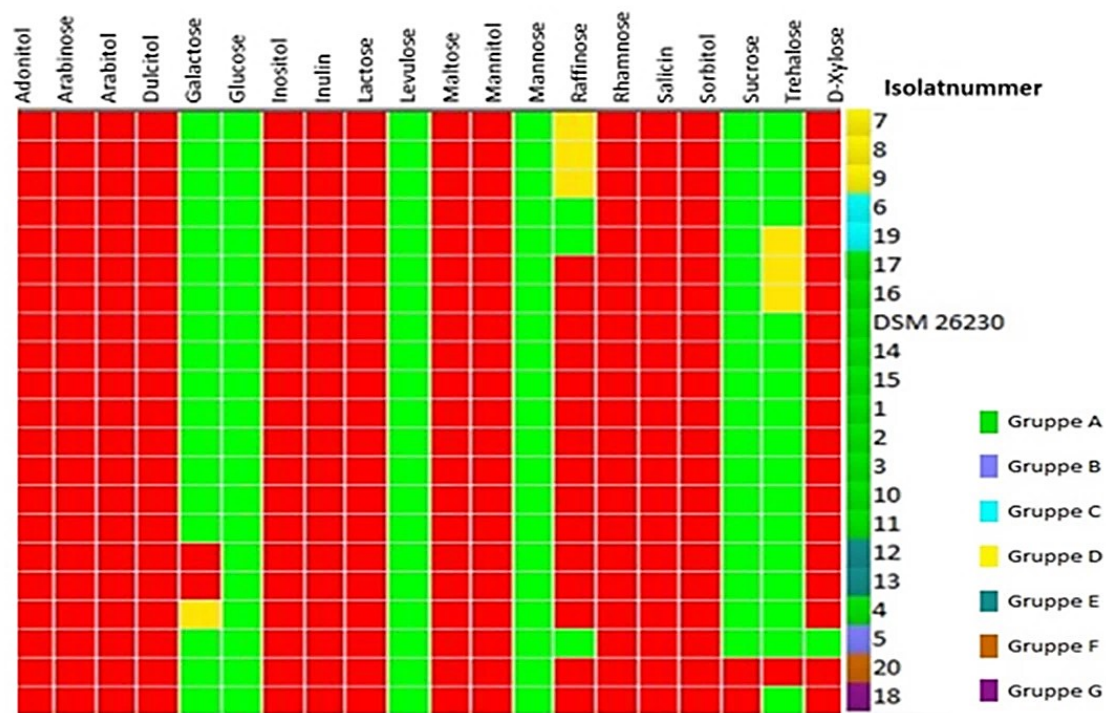


Abbildung 34: Reaktionen und davon abgeleitete Gruppeneinteilung in die Gruppen A-G mit entsprechender Isolatnummerierung. Rot = negativ; Gelb = schwach/langsam positiv; Grün: positiv. Auswertung erstellt mit Bionumerics 7.5™ (AppliedMath, Pearson correlation; Methode: UPGMA)

In Gruppe B befand sich nur ein Isolat (Isolat 5), da dieses das Einzige mit einer Positivreaktion bei D-Xylose war. Damit unterschied sich Gruppe B in seinem Reaktionsverhalten zu Gruppe A um 19 % (Abbildung 35).

Gruppe C wurde aus zwei Isolaten (Isolat 6 und 19) gebildet, wobei für Isolat 19 nur eine langsame Reaktion für α -Trehalose zu verzeichnen war. Beide Isolate zeigten eine positive Reaktion für Raffinose. Für sie wurde ein Übereinstimmungsgrad von 94,8 % mit Gruppe A errechnet. Gruppe D (Isolate 7, 8, 9) zeigte eine relative Ähnlichkeit zu Gruppe C, jedoch war in Gruppe D eine nur langsame bzw. schwache Reaktion für Raffinose zu erkennen, für Trehalose jedoch ein eindeutig positives Ergebnis. Die Unterscheidung zu Gruppe A wurde mit 2,7 % ermittelt. Gruppe E (Isolate 12 und 13) zeichnete sich durch die Non-Fermentation von Galactose aus, was eine Unterscheidung von 3 % zu Gruppe A ergab. In Gruppe F (Isolat 20) fiel die Reaktion für Sucrose und α -Trehalose negativ aus. Gruppe G (Isolat 18) zeigte keine Reaktion für Sucrose. Diese beiden Gruppen unterschieden sich damit zu 13,2 % von Gruppe A (Abbildung 35).

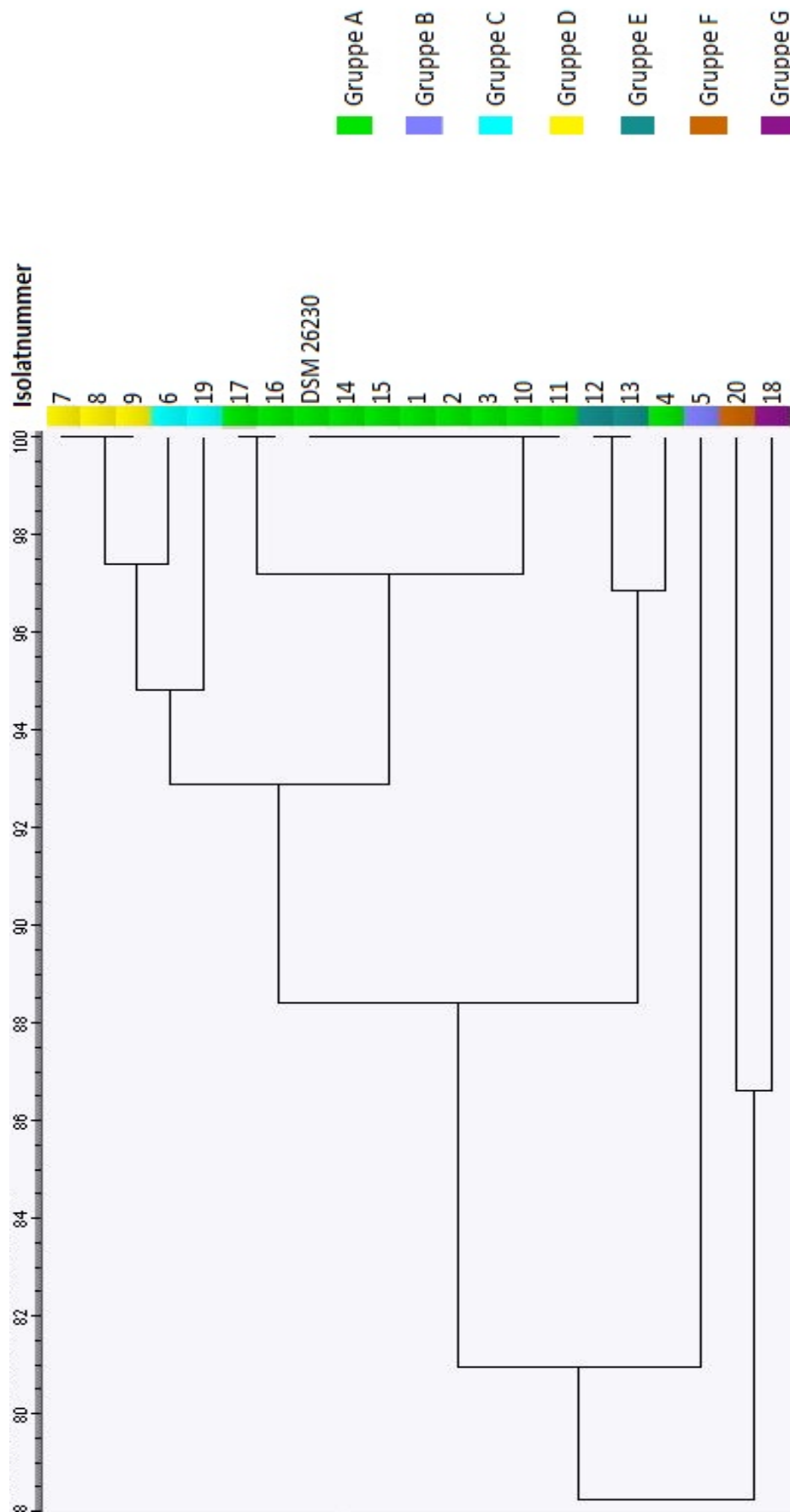


Abbildung 35: Einteilung der Isolate nach ihrem biochemischen Verhalten in die Gruppen A-G. Das Dendrogramm gibt Aufschluss über die Ähnlichkeit aller Gruppen in % im Vergleich zu Gruppe A. Gruppe D (Isolate 7; 8; 9) besitzt 97,5 % Ähnlichkeit zu Gruppe A; Gruppe C (Isolate 6; 19) zu 94,8 % Übereinstimmung, Gruppe E (Isolate 12; 13) unterscheidet sich mit 3 % von Gruppe A, Gruppe B (Isolat 5) zu 19 %, die Gruppen F (Isolat 20) und G (Isolat 18) zu 13,2 %; Auswertung erstellt mit Bionumerics 7.5™ (AppliedMath, Pearson correlation; Methode UPGMA)

4.3 Molekularbiologische Untersuchung

4.3.1 Gelelektrophorese und Sequenzierung

Durch die Amplifikation der D1/D2-Domäne mit den Primer-Paaren NL1/NL4 nach Libkind *et al.* (2003) ergaben sich Genabschnitte in einer Länge von etwa 650 bp, welche vor Aufreinigung der DNA zur Überprüfung der PCR mittels Gelelektrophorese sichtbar gemacht wurden (Abbildung 36).

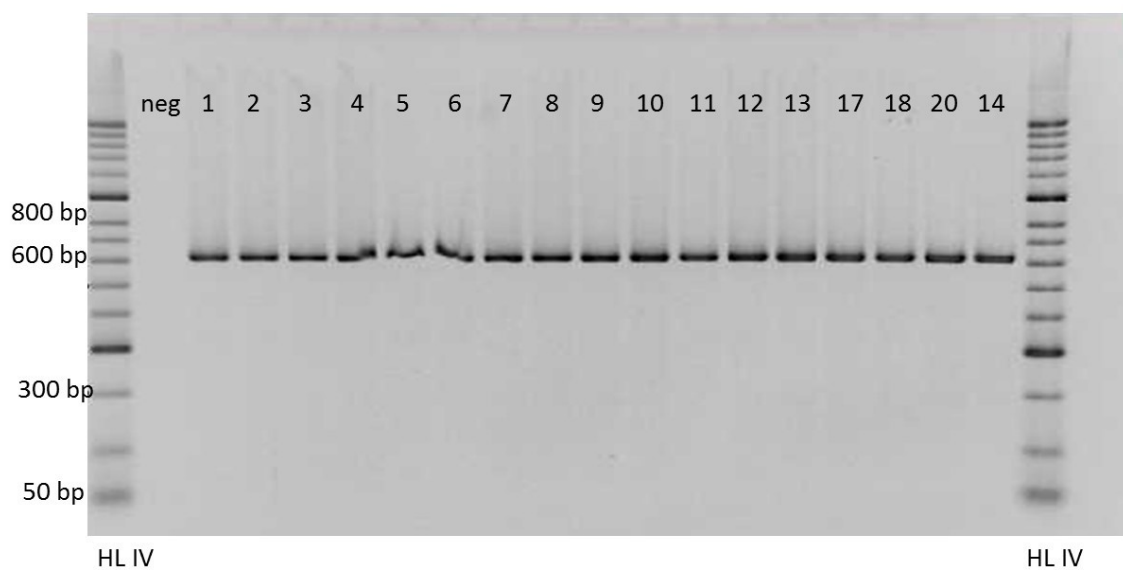


Abbildung 36: Gelelektrophoretische Auftrennung und Anfärbung mit Ethidium-Bromid (1 %ig) der 650 bp-langen Genabschnitte der D1/D2-Domäne; bp: Basenpaare; HL IV: HyperLadder IV (Bioline); neg: Negativkontrolle und Isolatnummern

Durch den Abgleich der erhaltenen Sequenzierungsergebnisse durch die Firma Eurofins Operon MWG, Ebersberg mit den Datenbanken konnten die Wildstämme mit einer Übereinstimmung von jeweils 99 % *K. psychrophila* Stamm H433 zugeordnet werden. Die zweitgrößte Übereinstimmung ergab sich mit *K. lodderae* (97 % Identität) und an dritter Stelle mit *K. ichnusensis* (96 % Identität). Auch die Wiederholung der Sequenzierung führte zu denselben Ergebnissen.

Der Abgleich der ITS-Region mit der Datenbank ergab eine Übereinstimmung mit einem unkultivierbaren Kompostpilz zu jeweils 99 % an erster Stelle, gefolgt von *Kazachstania* spp. (99 % Identität) an zweiter Stelle.

4.3.2 Vergleich der Basensequenzen

Der Vergleich der Basensequenzen (D1/D2-Domäne, ITS-Region) untereinander, sowie mit der Basenabfolge des Referenzstamms *K. psychrophila* DSM 26230 mit der Software Bionumerics 7.5™ (AppliedMath) ergab keine validierbaren Unterschiede in der Basenabfolge. Durch die wiederholte Sequenzierung konnte eine 100 %ige Übereinstimmung der Sequenzen mit der Sequenz von *K. psychrophila* DSM 26230 festgestellt werden.

4.4 Massenspektrometrische Identifizierung

4.4.1 Nährmedieneinfluss auf die Reproduzierbarkeit der Massenspektren

4.4.1.1 Nährmedieneinfluss auf *C. albicans* ATCC 10231

Im ersten Teil des Vorversuchs, der aus Gründen der besseren Beurteilbarkeit der erhaltenen Daten durch die Möglichkeit des Abgleichs mit hinterlegten Referenzdaten in der Software Biotyper 3.1.66 OC™ (Bruker Daltoniks) mit *C. albicans* ATCC 10231 durchgeführt wurde, konnte bei der visuellen Beurteilung der selbst erstellten Massenspektren von YGC-Agar eine schlechtere Qualität der Spektren mit zu geringem S/N-Verhältnis (< 3) und schlechter Auflösung der Massen (teilweise < 400 ppm) beobachtet werden. Außerdem ergaben sich aus der ersten Messung von YGC-Agar insgesamt drei Nulllinien (Flatlines), d.h. Massenspektren ohne Peaks.

Der Abgleich der Massenspektren mit der Software Biotyper 3.1.66 OC™ (Bruker Daltoniks) ergab eine sichere Speziesidentifikation, mit Ausnahme von YGC-Agar, von jedem der verschiedenen Nährmedien mit einem mittleren Score Value von $> 2,200$ (Tabelle 23).

Die zunächst schlechtere Qualität der Spektren von YGC-Agar konnte an den Versuchstagen 2 und 3 nicht mehr nachgewiesen werden, jedoch wirkten sich die schlechteren Ergebnisse von Versuchstag 1 negativ auf den errechneten mittleren Score Value (2,167) und erhöhend auf die relative Standardabweichung (12,8 %) aus (Tabelle 23). Die mittlere Anzahl der Massen aus den jeweils 27 Einzelspektren/Nährmedium bewegte sich bei den hefespezifischen Nährböden in einem Bereich zwischen 46 und 59 Massen. Bei den Messungen von CBA wurden im Mittel 79 Massen errechnet (Tabelle 23). Zusammenfassend konnte für *C. albicans* ATCC 10231 eine im wesentlichen einheitliche Messbarkeit von den hefespezifischen Nährmedien beobachtet werden, während von CBA insgesamt mehr Massen erkannt wurden (Abbildung 37). Eine sichere Identifizierung war von allen verwendeten Nährmedien möglich, wobei die geringste relative Standardabweichung mit SAB-Agar erzielt werden konnte.

Tabelle 23: Übersicht zur Auswertung der Massenspektren in Abhängigkeit der verwendeten Nährmedien für *C. albicans* ATCC 10231

Nährmedium	Mittelwert Massen	RSD _{Massen} [%]	mittlerer SV	RSD _{SV} [%]
CBA	79	7,9	2,230	4,9
YGC	50	12,1	2,167	12,8
GYP	59	11,9	2,248	3,6
MEA ⁺	48	8,2	2,272	4,84
SAB	46	6,6	2,264	3,3

CBA: Columbia-Schafblut-Agar; YGC: Hefeextrakt-Glucose-Chloramphenicol-Agar; GYP: Glucose-Hefeextrakt-Pepton-Agar; MEA⁺: Malz-Extrakt-Agar plus Novobiocin; SAB: Sabouraud-Agar; RSD: relative Standardabweichung; SV: Score Value

Zusätzlich zur visuellen Beurteilung mit FlexAnalysis 3.4TM (Bruker Daltoniks) wurde die Auswertung der Massenspektren durch die Darstellung im Pseudogel der Software ClinProTools 3.0TM (Bruker Daltoniks) vorgenommen (Abbildung 37). Hohe Intensitäten traten im Massenbereich zwischen 3 000 und 4 000 Da auf, sowie im Bereich von 6 000 bis 7 000 Da (rote Markierungen). Im höheren Massenbereich zwischen 9 000 Da und 14 000 Da kam es zu einer Darstellung von Massen geringerer Intensität, die jedoch auf allen fünf Nährmedien vertreten waren.

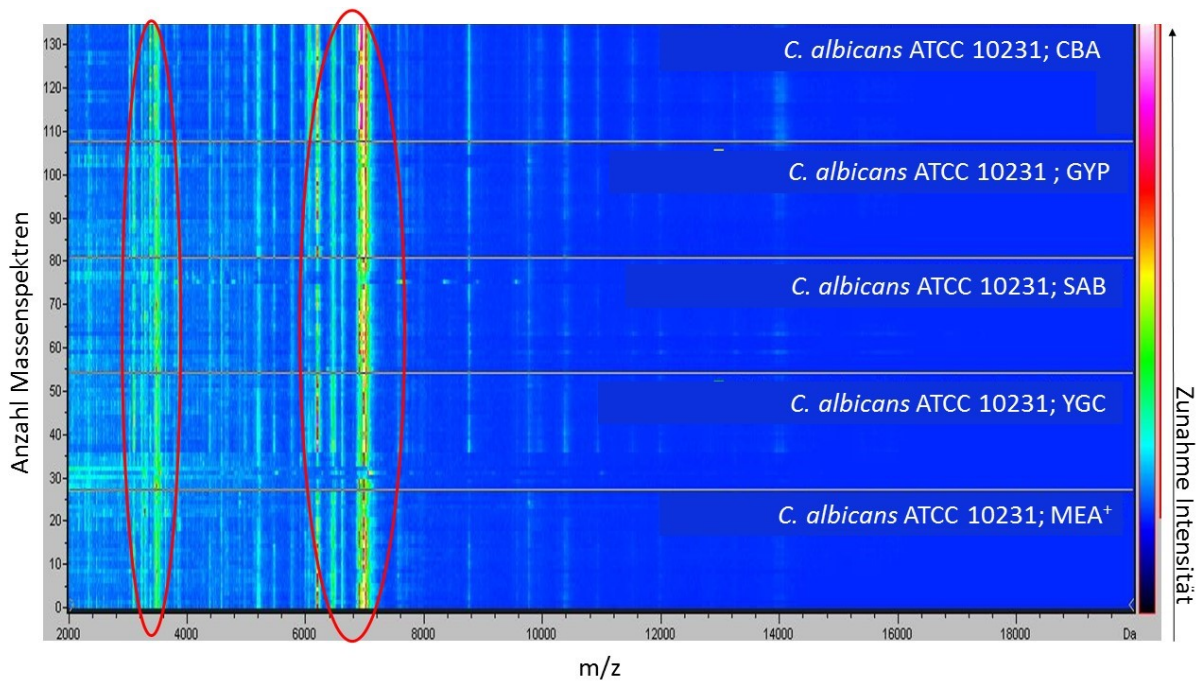


Abbildung 37: Pseudogeldarstellung der Massenspektren von *C. albicans* ATCC 10231 durch ClinProTools™ 3.0 (Bruker Daltoniks) gemessen nach der Anzucht auf unterschiedlichen Nährmedien (Columbia-Schafblut-Agar (CBA), Glucose-Hefeextrakt-Pepton (GYP)-Agar, Sabouraud (SAB)-Agar, Hefeextrakt-Glucose-Chloramphenicol (YGC)-Agar und Malz-Extrakt-Agar plus Novobiocin (MEA⁺) über 24 h bei +25 °C; rote Markierungen: Massenbereich hoher Intensitäten

4.4.1.2 Nährmedieneinfluss auf *K. psychrophila* DSM 26230

Die visuelle Auswertung der Spektren für *K. psychrophila* DSM 26230 mittels FlexAnalysis 3.4™ (Bruker Daltoniks) ergab in Bezug auf die hefespezifischen Nährmedien (GYP, MEA⁺, YGC, SAB) im Vergleich zueinander keine erkennbaren Unterschiede. Im Vergleich mit den Spektren, die auf der Anzucht von CBA basierten, konnten jedoch Unterschiede im Fingerprint festgestellt werden (). Bei der Beurteilung fiel eine Masse bei 2174 Da auf, die von den hefespezifischen Nährmedien nicht nachweisbar war (Abbildung 38, schwarzer Pfeil). Weiterhin konnte für die Masse bei 3340 Da eine hohe Intensität mit einem maximalen Wert von 6489 festgestellt werden (*).

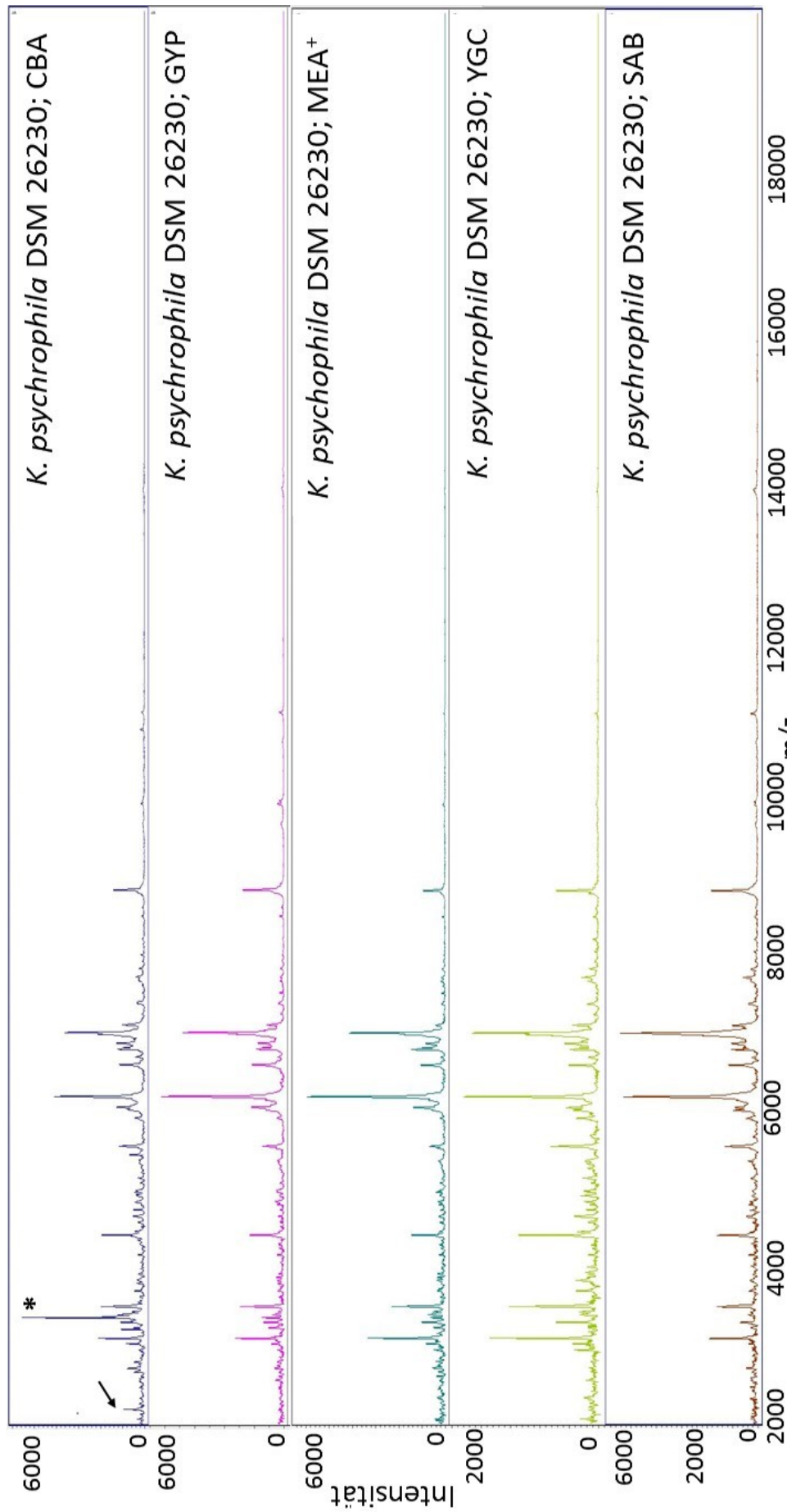


Abbildung 38: Gegenüberstellung der generierten Massenspektren von *K. psychrophila* DSM 26230 nach 72 h Inkubation bei +10 °C auf verschiedenen Nährmedien (Columbia-Schafblut-Agar (CBA), Glucose-Hefeextrakt-Peptone (GYP)-Agar, Sabouraud (SAB)-Agar, Hefeextrakt-Glucose-Chloramphenicol (YGC)-Agar und Malz-Extrakt-Agar plus Novobiocin (MEA⁺); Pfeil: zusätzliche Masse bei 2174 Da; Stern: hohe Intensität bei 3340 Da; Software FlexAnalysis 3.4™ (Bruker Daltoniks); baseline subtracted, geglättet; m/z : Masse-zu-Ladung-Verhältnis

In der Pseudogeldarstellung mit Hilfe von ClinProTools 3.0™ (Bruker Daltoniks) konnte das Vorhandensein der Masse bei 2174 Da von CBA, die von den anderen Nährmedien nicht nachweisbar war, bestätigt werden (Abbildung 39, roter Kreis). In der Bande "CBA" wurden bei 2 174 Da Intensitäten von bis zu 1821 bei geeignetem S/N-Verhältnis (>3) festgestellt. Weiterhin war die Intensität für die Masse bei 3 440 Da von CBA als höher zu bewerten (bis zu 6489) als bei den übrigen Nährmedien (bis zu 1200) (Abbildung 39, orange Markierung).

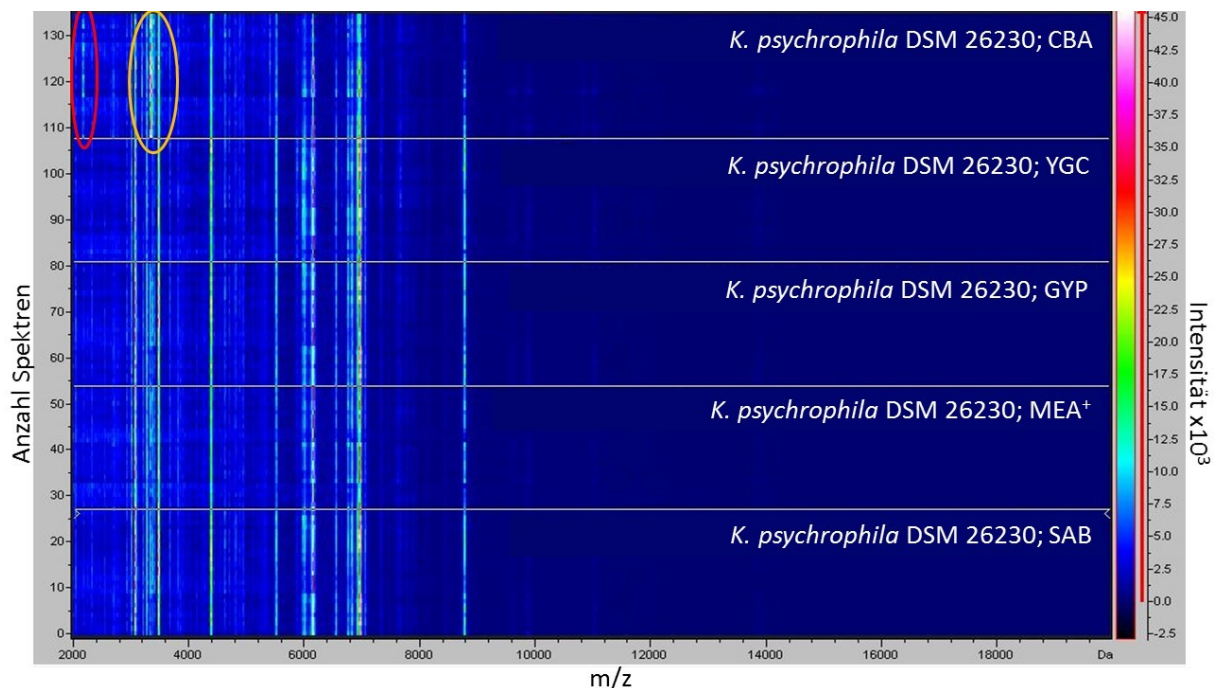


Abbildung 39: Pseudogeldarstellung der Massenspektren von *K. psychrophila* DSM 26230 durch ClinProTools 3.0™ (Bruker Daltoniks) gemessen nach der Anzucht auf unterschiedlichen Nährmedien (Columbia-Schafblut-Agar (CBA), Glucose-Hefeextrakt-Pepton (GYP)-Agar, Sabouraud (SAB)-Agar, Hefeextrakt-Glucose-Chloramphenicol (YGC)-Agar und Malz-Extrakt-Agar mit Novobiocin (MEA⁺) über 72 h bei +10 °C; m/z: Masse-zu-Ladungsverhältnis; rote Markierung: zusätzliche Masse bei 2174 Da; orange Markierung: hohe Intensität der Masse bei 3340 Da

Von 27 Messungen konnte die Masse bei 2174 Da 19 Mal mit einem S/N-Verhältnis >3 und einer errechneten mittleren Intensität von 735 nachgewiesen werden. Die Intensitäten dieser Masse variierten dabei in einem Bereich von 366 bis 1821. Weiterhin kam es im Massenbereich von 3 340 Da zu einer Intensitätsumkehr (Abbildung 38, schwarzer Stern). Während diese Masse bei der Messung von GYP-Agar eine mittlere Intensität von 1159 (RSD 43,9 %) erreichte, konnte von CBA eine mittlere Intensität von 3190 bei einer relativen Standardabweichung von 66,4 % gemessen werden, was nahe dem Dreifachen

entspricht. Die mittlere Intensität gemessen von MEA⁺ betrug 1021 (RSD 59,3 %), während bei der Messung von YGC-Agar und SAB-Agar kein ausreichendes S/N-Verhältnis erreicht wurde und die Masse (3340 Da) somit nicht nachweisbar war (Tabelle 24).

Tabelle 24: Übersicht über die Variation der Peakintensitäten in Abhängigkeit des Nährmediums für *K. psychrophila* DSM 26230

Nährmedium	Masse			
	2174 Da mittlere Intensität	RSD [%]	3340 Da mittlere Intensität	RSD [%]
CBA	735	59,4	3190	66,4
GYP	n.n.	-	1159	43,9
YGC	n.n.	-	n.n.	n.n.
SAB	n.n.	-	n.n.	n.n.
MEA ⁺	n.n.	-	1021	59,3

Da: Dalton; CBA: Columbia-Schafblutagar; GYP: Glucose-Hefeextrakt-Pepton-Agar; YGC: Hefeextrakt-Glucose-Chloramphenicol-Agar; SAB: Sabouraud-Agar; MEA⁺: Malz-Extrakt-Agar plus Novobiocin; RSD: relative Standardabweichung; n.n.: nicht nachweisbar

Der Abgleich der Massenspektren mit der Software Biotyper 3.0 OC™ (Bruker Daltoniks) ergab eine sichere Speziesidentifikation von jedem der verwendeten Nährmedien mit einem mittleren Score Value von > 2,200 (Tabelle 25). Die mittlere Anzahl an Massen bewegte sich im Bereich von 38,3 (SAB-Agar) bis 51,1 (YGC-Agar), wobei die Messungen von CBA die größte relative Standardabweichung (RSD) von 20,1 % ergaben. Die oben beschriebene Abweichung der Massenspektren, gemessen von CBA, hatte keinen merklichen Einfluss auf die richtige Identifikation von *K. psychrophila* DSM 26230.

Tabelle 25: Übersicht zur Auswertung der Massenspektren in Abhängigkeit der verwendeten Nährmedien für *K. psychrophila* DSM 26230

Nährmedium	Mittelwert Massen	RSD _{Massen} [%]	mittlerer SV	RSD _{SV}
CBA	49,7	20,1	2,338	4,1
YGC	51,1	19,0	2,463	3,4
GYP	49,75	13,6	2,507	2,7
MEA ⁺	42,2	12,8	2,464	3,4
SAB	38,3	14,5	2,296	4,1

CBA: Columbia-Schafblut-Agar; YGC: Hefeextrakt-Glucose-Chloramphenicol-Agar; GYP: Glucose-Hefeextrakt-Pepton-Agar; MEA⁺: Malz-Extrakt-Agar plus Novobiocin; SAB: Sabouraud-Agar; RSD: relative Standardabweichung; SV: Score Value

Aufgrund der höheren Reproduzierbarkeit der Spektren bei der Messung von den hefespezifischen Nährböden wurden die weiteren massenspektrometrischen

Untersuchungen nicht von CBA unternommen. Da von SAB-Agar die größtmögliche Wachstumsrate in einem Zeitraum von 72 Stunden erzielt werden konnte und den Herstellerempfehlungen entspricht (Anonymous, 2014), wurde dieser für alle weiteren massenspektrometrischen Messungen als Anzuchtmedium verwendet.

4.4.2 Untersuchungen zur Messbarkeit von *K. lodderae* CBS 2757

Durch das in Kapitel 3.2.5.1.1 beschriebene Extraktionsprotokoll konnten für *K. lodderae* CBS 2757 keine Massenspektren generiert werden, die den Kriterien für die MSP-Erstellung (Kapitel 2.3.4) entsprachen.

Die Massenspektren, die nach einer Anzucht über 48 h auf SAB-Agar bei +25 °C mit einer Einwirkzeit der Ameisensäure von 5 Minuten erstellt wurden (Abbildung 40a), wiesen eine hohe Inhomogenität untereinander auf. Weiterhin fiel das Verhältnis von Signal zu Rauschen (S/N) zu niedrig aus (<3). Der überwiegende Anteil der Massen wies eine zu geringe Intensität von < 500 auf (Abbildung 40b). Die Auswertung ergab 7 Massen mit einem ausreichenden S/N-Verhältnis > 500, was für eine MSP-Erstellung unzureichend ist. Der Massenbereich im Zoom-Ausschnitt der Abbildung 40b zwischen 5800 – 6800 Da ist beispielhaft gewählt und dient der Veranschaulichung.

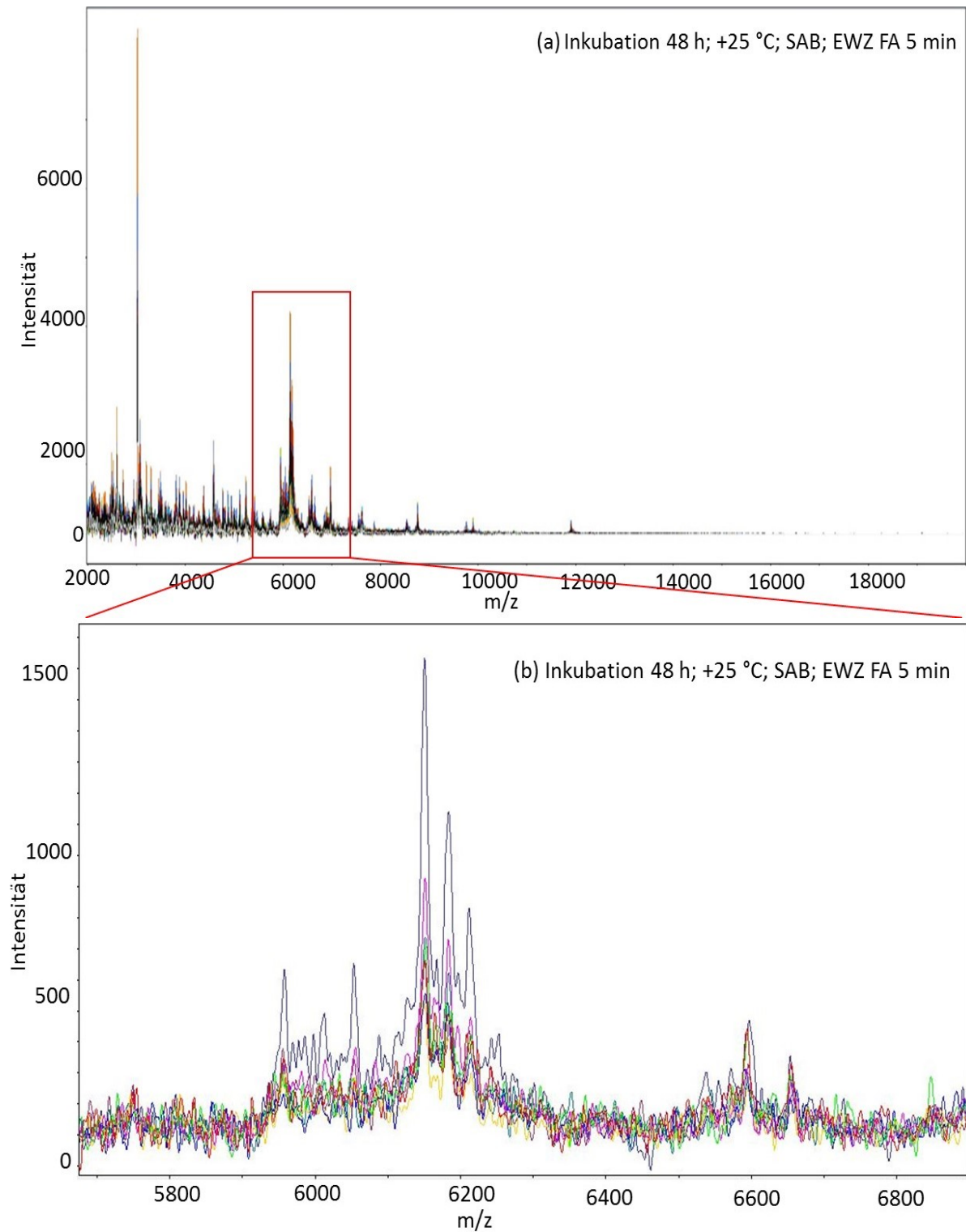


Abbildung 40: (a) Massenspektrum für *K. lodderae* CBS 2757; Kultivierung über 48 h bei +25 °C auf Sabouraud (SAB)-Agar gemäß den Vorgaben der CBS (Utrecht); Extraktionsprotokoll mit Ethanol (100 %) und Ameisensäure (FA, 70 %) mit Einwirkzeit (EWZ) über 5 min; (b) Zoomansicht des Massenbereichs 5800 bis 6800 Da aus (a); baseline subtracted, geglättet; FlexAnalysis 3.4™ (Bruker Daltoniks)

4.4.2.1 Verlängerung der Inkubationszeit mit Ameisensäure (70 %)

Durch die reine Verlängerung der Inkubationszeit konnte keine gesteigerte Qualität der Massenspektren für *K. lodderae* CBS 2757 erzielt werden. Bei der Auswertung der Spektren, die mit einer verlängerten Einwirkzeit der Ameisensäure von 10 Minuten extrahiert wurden, konnte zunächst eine Zunahme der verwertbaren Massen ($n = 17$) im Vergleich zur Einwirkzeit der Ameisensäure über 5 Minuten ($n = 7$) verzeichnet werden (Tabelle 26). Bei einer Einwirkzeit von 12 und 15 Minuten war die Zahl verwertbarer Massen jedoch wieder rückläufig (12,3 bzw. 15) (Tabelle 26). Hier konnte eine Abnahme der Peakintensitäten (< 500) (Abbildung 41) im Vergleich zur Inkubationsdauer von 5 Minuten festgestellt werden (zwischen 500-1000).

Tabelle 26: Ergebnisse der Variation der Einwirkzeit von Ameisensäure (70 %)

Methode			Anzahl Massen mit $S/N \geq 3$ [ar. Mittel aus 27 Spektren]	RSD [%]
Anzuchtdauer [h]	T [°C]	EWZ FA (70 %) [min]		
48	25	5	7,0	55,0
48	25	10	17,0	43,2
48	25	12	12,3	55,6
48	25	15	15,0	64,8

h: Stunden; min: Minuten; EWZ: Einwirkzeit; FA: Ameisensäure; S/N: Verhältnis Signal-zu-Rauschen; RSD: relative Standardabweichung; ar.: arithmetisches

Die Spektren von geringster Aussagekraft wurden bei einer Inkubationszeit von 15 Minuten erreicht, da die Massen nur mit geringen Intensitäten gemessen werden konnten und durch ein zu hohes Verhältnis von Signal-zu-Rauschen größtenteils überlagert wurden. Darüberhinaus kam es zu zahlreichen Nulllinien.

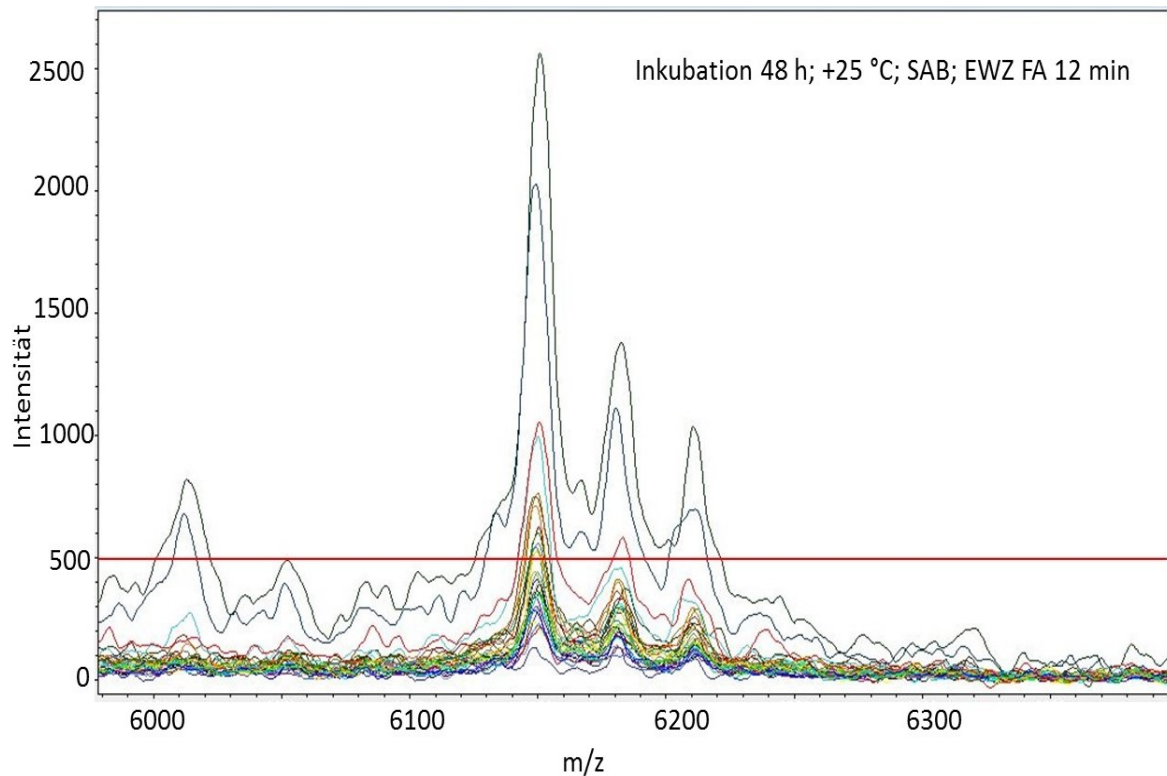


Abbildung 41: Zoomansicht des Massenspektrums für *K. lodderae* CBS 2757 des Massenbereichs von 6000 bis 6300 Da; Kultivierung über 48 Stunden bei +25 °C auf Sabouraud (SAB)-Agar, Proteinextraktion mit Ethanol (100 %) und Ameisensäure (FA, 70 %); Einwirkzeit (EWZ) Ameisensäure (FA) 12 min; baseline subtracted, geglättet; FlexAnalysis 3.4™ (Bruker Daltoniks)

4.4.2.2 Reduktion der Kultivierungszeit

Im Versuchsansatz der kürzeren Kultivierung von 12 Stunden bei +25 °C und der darauffolgenden Proteinextraktion mit Ethanol (100 %) und Ameisensäure (70 %) konnten im Vergleich zum Versuch mit einer Anzuchtdauer von 48 Stunden bei sonst gleichem Extraktionsverfahren qualitativ bessere Massenspektren bei insgesamt höherem S/N-Verhältnis generiert werden (Abbildung 42), als es bei der Anzucht über 48 Stunden bei +25 °C der Fall war. Dies zeigte sich auch nach einer Kultivierungsdauer von 18 Stunden bei +25 °C auf SAB-Agar (Abbildung 43).

In der Zoomansicht wird deutlich, dass es zu keiner Verschiebung der Massen kommt, gleichmäßige Intensitäten erzielt werden und das S/N-Verhältnis als ausreichend (> 3) zu beurteilen ist. Weiterhin wurden höhere Intensitäten der einzelnen Massen erreicht, die mit der zuvor durchgeführten Anzucht von 48 Stunden meist unter 500 lag. Daraus ergab sich nach

einer Anzuchtdauer von 12 Stunden auf MEA⁺ und einer Einwirkzeit der Ameisensäure (70 %) von 10 Minuten die größte mittlere Anzahl verwertbarer Massen ($n = 69,1$) mit der geringsten relativen Standardabweichung (RSD) von 7,8 % (Tabelle 27).

Ähnlich gute Ergebnisse wurden mit der Messung von SAB-Agar erzielt (mittlere Massenzahl 54,5/RSD 8,5), sodass Sabouraud-Agar als Ursache für die in Kapitel 4.4.2 erläuterte Problematik ausgeschlossen werden konnte. Die Messbarkeit von *K. lodderae* CBS 2757 nach einer Anzuchtdauer über 18 Stunden und einer Einwirkzeit der Ameisensäure über 5 Minuten konnte eine mittlere Massenzahl von 47,6 (RSD 21,3 %) erzielt werden. Mit einer Einwirkzeit der Ameisensäure von 8 und 10 Minuten war ein Rückgang der mittleren Massenzahl mit einhergehender Erhöhung der RSD (22,5 bzw. 20,1 %) zu beobachten (Tabelle 27). Da bei der Anzuchtdauer über 18 Stunden die Einwirkung der Ameisensäure (5 min) zum oben genannten Protokoll nicht verlängert wurde und trotzdem qualitativ angemessene Spektren erzeugt werden konnten, kann von einem Einfluss der Anzuchtdauer auf die massenspektrometrische Messbarkeit von *K. lodderae* CBS 2757 ausgegangen werden (Abbildung 44).

Tabelle 27: Ergebnisse der Variation der Anzuchtbedingungen von *K. lodderae* CBS 2757

Anzuchtdauer [h]	Methode		Anzahl Massen mit $S/N \geq 3$ [ar. Mittel aus 27 Spektren]	RSD [%]
	T [°C]	EWZ FA (70 %) [min]		
12 (MEA ⁺)	25	10	69,1	7,8
12 (SAB)	25	10	54,5	8,5
18 (SAB)	25	5	47,6	21,3
18 (SAB)	25	8	45,1	22,5
18 (SAB)	25	10	44,1	20,1

h: Stunden; min: Minuten; EWZ: Einwirkzeit; FA: Ameisensäure; S/N: Verhältnis Signal-zu-Rauschen; RSD: relative Standardabweichung; MEA⁺: Malz-Extrakt-Agar plus Novobiocin; SAB: Sabouraud-Agar; ar: arithmetisches

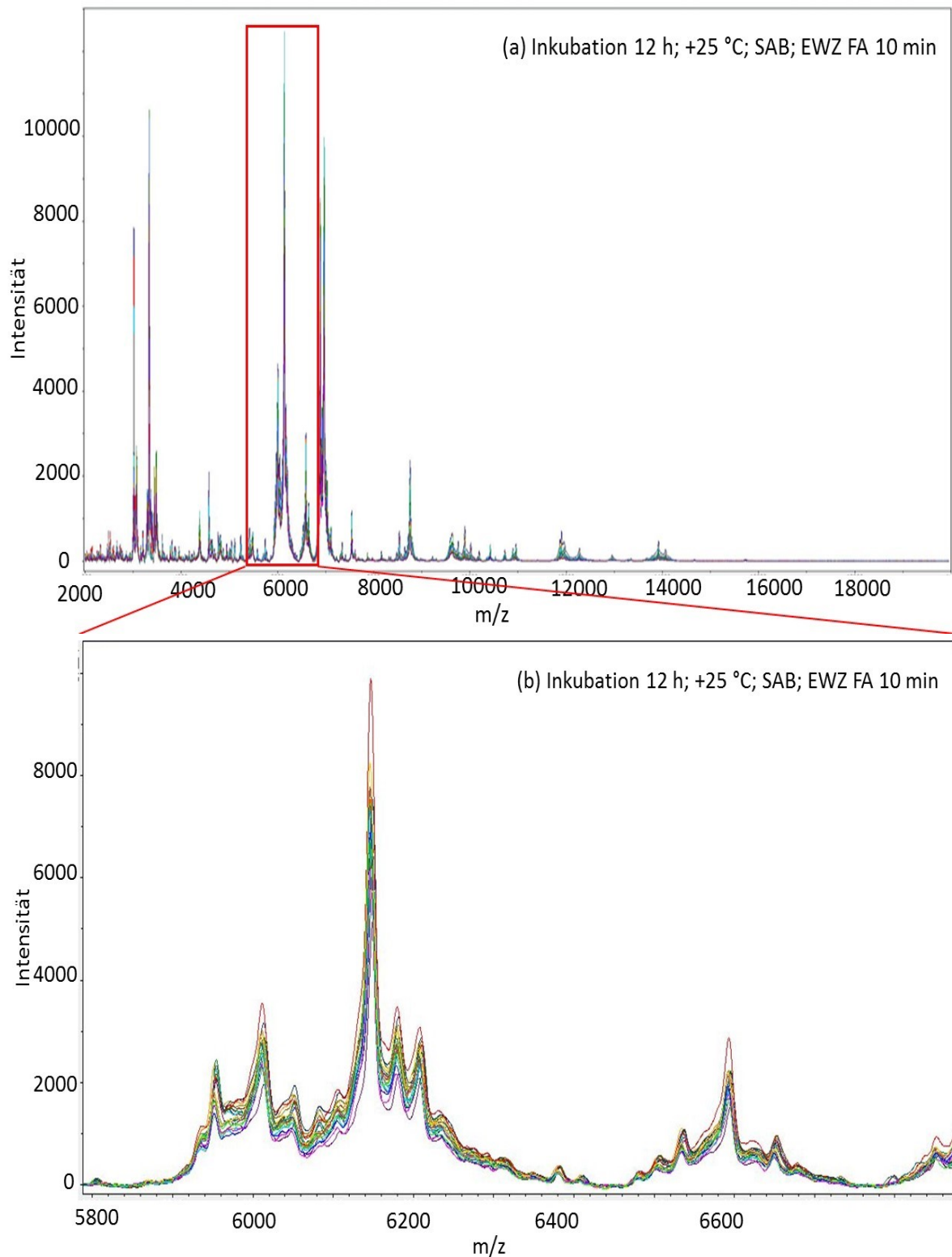


Abbildung 42: (a) Massenspektrum für *K. lodderae* CBS 2757; Kultivierung über 12 Stunden bei +25 °C auf Sabouraud (SAB)-Agar, Proteinextraktion mit Ethanol (100 %) und Ameisensäure (70 %); Einwirkzeit (EWZ) Ameisensäure (70 %) 10 Minuten; (b) Zoom-Ausschnitt von (a) im Massenbereich 6000 – 6200 Da; baseline subtracted, geglättet; FlexAnalysis 3.4TM (Bruker Daltoniks); m/z: Masse-zu-Ladung-Verhältnis

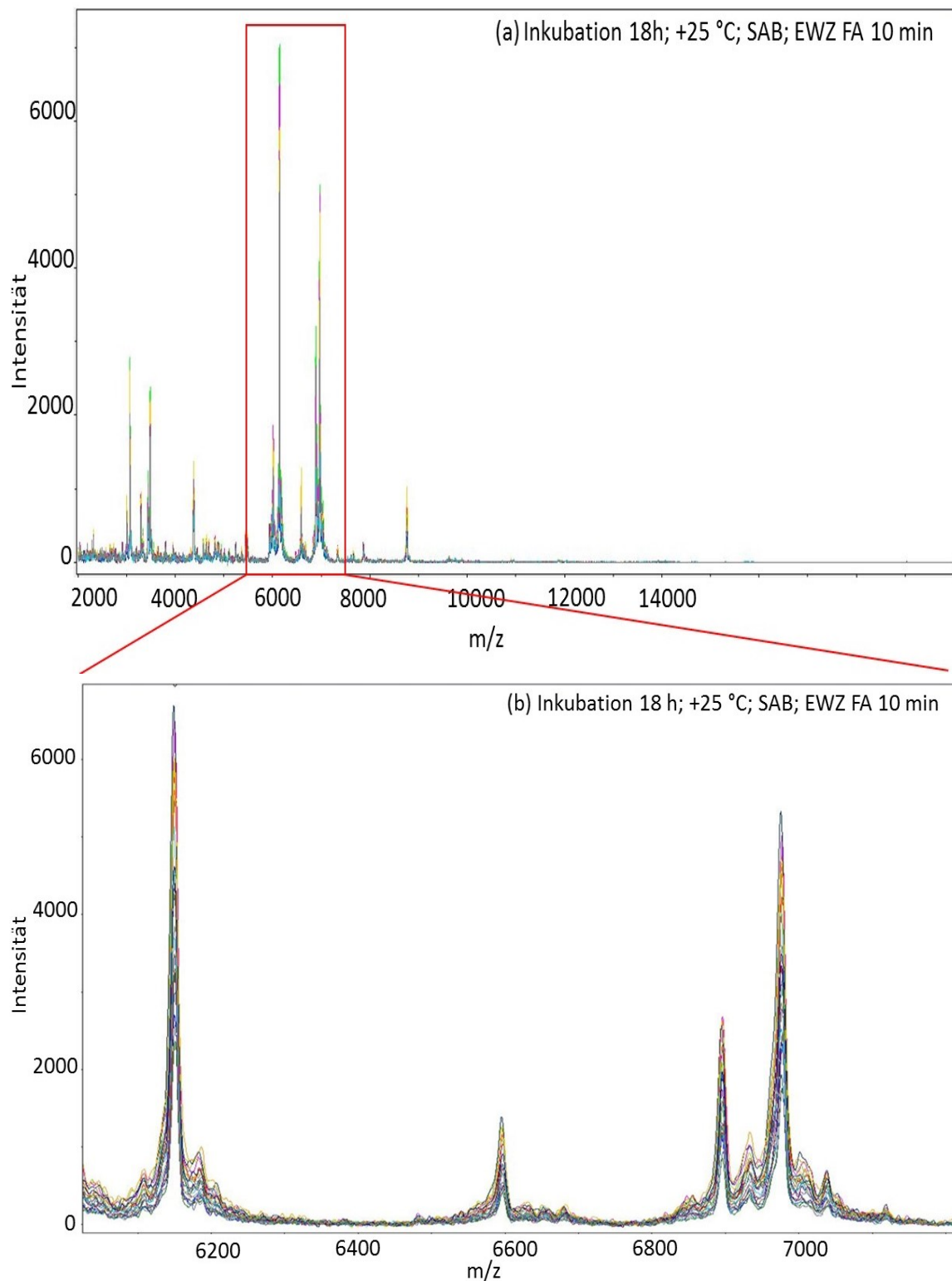


Abbildung 43: (a) Massenspektren für *K. lodderae* CBS 2757; Kultivierung über 18 Stunden bei +25 °C auf Sabouraud (SAB)-Agar, Proteinextraktion mit Ethanol (100 %) und Ameisensäure (70 %); Einwirkzeit (EWZ) Ameisensäure 10 min; (b) Zoom-Ausschnitt von (a) im Massenbereich von 6 – 7,2 kDa; baseline subtracted, geglättet; FlexAnalysis 3.4™ (Bruker Daltoniks); m/z: Masse-zu-Ladungs-Verhältnis

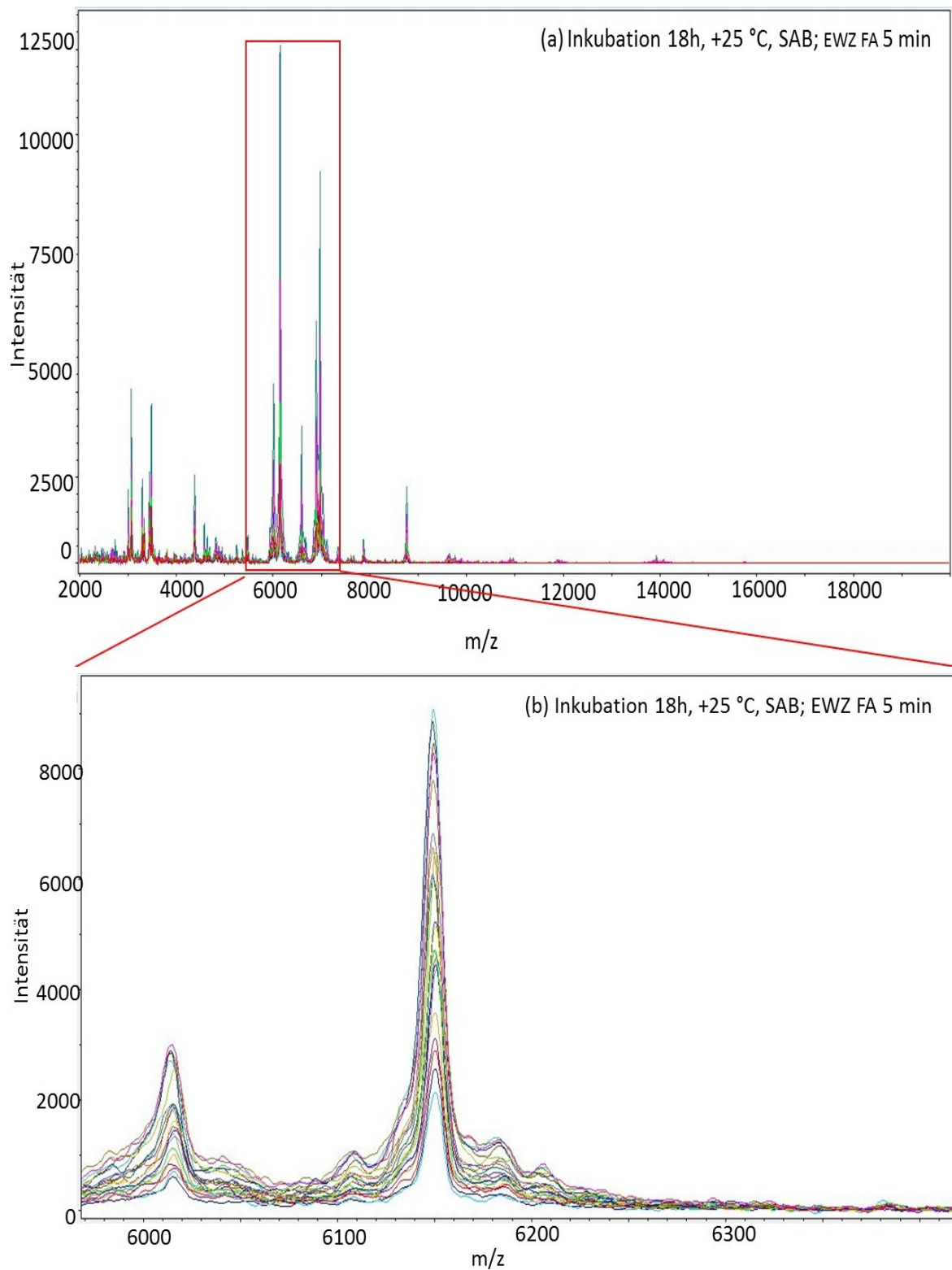


Abbildung 44: (a) Massenspektren für *K. lodderae* CBS 2757; Kultivierung über 18 Stunden bei +25 °C auf Sabouraud (SAB)-Agar, Proteinextraktion mit Ethanol (100 %) und Ameisensäure (70 %); Einwirkzeit (EWZ) Ameisensäure (70 %) 5 min; (b) Zoom-Ausschnitt von (a) im Massenbereich von 6 – 7,2 kDa; baseline subtracted, geglättet; FlexAnalysis 3.4™ (Bruker Daltoniks); m/z: Masse-zu-Ladungs-Verhältnis

4.4.2.3 Reduktion der Kultivierungstemperatur

Durch die Reduktion der Kultivierungstemperatur von +25 °C auf +10 °C bei einer Kultivierungsdauer von 48 Stunden konnten gleichwertige Spektren im Vergleich zum Versuch mit einer verkürzten Inkubationszeit von 18 Stunden und einer Temperatur von +25 °C generiert werden (Abbildung 45). Im Mittel zeigten 52,8 Massen (RSD 13,4 %) ein S/N-Verhältnis von mindestens 3.

Des Weiteren kam es zu keiner Massenverschiebung innerhalb der Peaks (Abbildung 45b). Auch die Intensitäten erreichten ausreichende Werte (> 500). Abbildung 45b zeigt die bisher als Beispiel herangezogene Masse (Massenbereich 5,8 – 6,7 kDa) mit durchschnittlichen Intensitäten von > 1000.

Durch die Reduktion der Kultivierungstemperatur bei der Anzucht von *K. lodderae* CBS 2757 konnte gezeigt werden, dass eine Verkürzung der Kultivierungsphase nicht notwendig wird, um qualitativ gute Massenspektren zu erhalten. Auch auf eine verlängerte Einwirkzeit der Ameisensäure (70 %) von 10 Minuten kann durch die Reduktion der Umgebungstemperatur verzichtet werden (Tabelle 28).

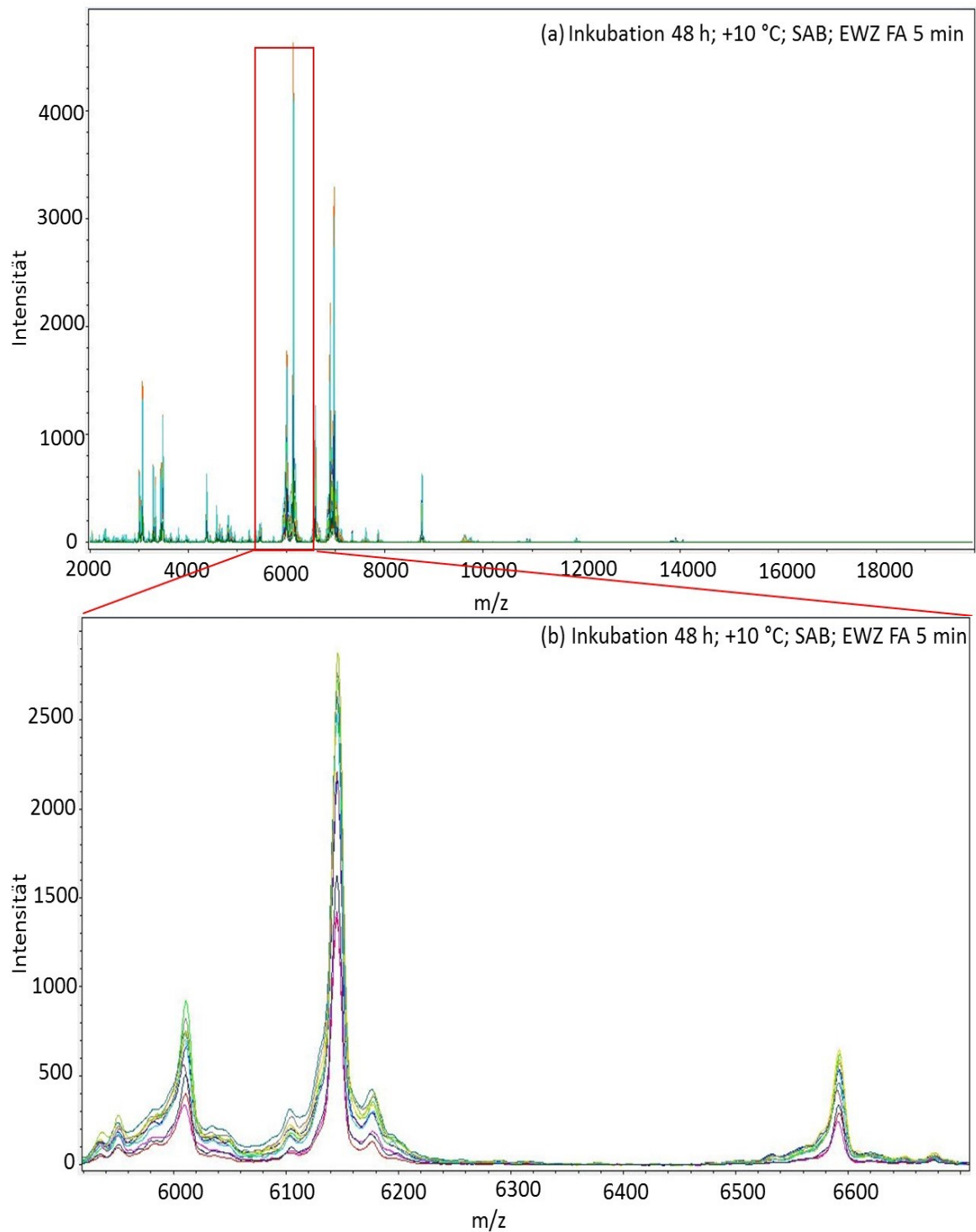


Abbildung 45: (a) Massenspektrum für *K. lodderae* CBS 2757; Kultivierung über 48 Stunden bei +10 °C auf Sabouraud (SAB)-Agar, Proteinextraktion mit Ethanol (100 %) und Ameisensäure (70 %); Einwirkzeit (EWZ) für Ameisensäure (FA) (70 %) 5 min; (b): Zoom-Ausschnitt von (a); baseline subtracted, geglättet; FlexAnalysis 3.4™ (Bruker Daltoniks); m/z: Masse-zu-Ladung-Verhältnis

4.4.2.4 Zusammenfassung

Bei der rechnerischen Auswertung der Massenspektren (n=27), die auf Basis der standardmäßig angewandten Proteinextraktion erzeugt wurden, konnten die Eindrücke einer unzureichenden Qualität der Spektren bei der visuellen Beurteilung bestätigt werden. Durch das reguläre Proteinextraktionsprotokoll (Kultivierung für 48 Stunden bei +25 °C auf SAB-Agar/Einwirkzeit Ameisensäure 5 Minuten) waren im Mittel sieben Massen bei einer relativen Standardabweichung von 55 % auffindbar, die dem geforderten Verhältnis von Signal-zu-Rauschen von ≥ 3 entsprachen (Tabelle 28).

Mit einer verlängerten Einwirkzeit der Ameisensäure von 10 Minuten konnte die mittlere Anzahl verwertbarer Massen auf 17,0 mit einer relativen Standardabweichung von 43,2 % gesteigert werden, wohingegen die Massenzahl mit einer Einwirkzeit von 12 und 15 Minuten wieder gemindert wurde (Tabelle 28).

Die besten Ergebnisse konnten mit einer Verkürzung der Anzuchtdauer auf 12 Stunden auf MEA⁺ bzw. SAB-Agar und einer Einwirkzeit der Ameisensäure über 10 Minuten erzielt werden, da hier die durchschnittliche Massenzahl von 69,1 und 54,5 wesentlich erhöht und die relative Standardabweichung von 7,8 bzw. 8,5 % geringgehalten werden konnte. Ähnlich gute Ergebnisse (im Mittel 52,8 Massen, RSD 13,4 %) konnten mit der Verringerung der Inkubationstemperatur von +25 °C auf +10 °C erreicht werden, wobei eine verlängerte Einwirkzeit der Ameisensäure auf 10 Minuten nicht notwendig war (Tabelle 28).

Tabelle 28: Zusammenfassende Darstellung der Versuche zur Messbarkeit von *K. lodderae*

Methode			Anzahl Massen mit S/N ≥ 3 [ar. Mittel aus 27 Spektren]	RSD [%]
Anzuchtdauer [h]	T [°C]	EWZ FA (70 %) [min]		
48 (SAB)	25	5	7,0	55,0
48 (SAB)	25	10	17,0	43,2
48 (SAB)	25	12	12,3	55,6
48 (SAB)	25	15	15,0	64,8
12 (MEA ⁺)	25	10	69,1	7,8
12 (SAB)	25	10	54,5	8,5
18 (SAB)	25	5	47,6	21,3
18 (SAB)	25	8	45,1	22,5
18 (SAB)	25	10	44,1	20,1
48 (SAB)	10	5	52,8	13,4

h: Stunden; min: Minuten; EWZ: Einwirkzeit; FA: Ameisensäure; S/N: Verhältnis Signal-zu-Rauschen; RSD: relative Standardabweichung; MEA⁺: Malz-Extrakt-Agar plus Novobiocin; SAB: Sabouraud-Agar; ar.: arithmetisches

4.4.3 Erstellung von Referenzspektren

Der Abgleich von *K. psychrophila* DSM 26230, der Wildstämme, sowie der weiteren Referenzstämme *K. lodderae* CBS 2757, *K. servazzii* CBS 4311, *K. unispora* CBS 398, *M. frigida* DSM 4634 und *M. gelida* DSM 70882 in der verwendeten Datenbank (Version 3.0, Bruker Daltoniks) führte zu keiner erfolgreichen Identifikation (Score Values jeweils < 1,699). Im Verlauf dieser Studie kam es zu einem Softwareupdate durch die Herstellerfirma (Version 3.1.66, Bruker Daltoniks), wodurch Referenzdaten für *K. lodderae* CBS 2757 und *K. unispora* enthalten waren, wobei es sich bei *K. unispora* nicht um den Stamm CBS 398 handelt. Eine Identifizierung der beiden letztgenannten *Kazachstania*-Spezies wurde durch das Softwareupdate möglich, jedoch nicht eine Identifizierung von *K. psychrophila*, *K. servazzii* und *Mrakia* spp. Aus diesem Grund wurden für diese Spezies mittels der Software Biotyper 3.1.66 OC™ (Bruker Daltoniks) Referenzspektren erstellt, die aus mindestens 20 Einzelspektren gebildet wurden (Abbildung 46), welches die vom Hersteller geforderten maximal möglichen Massen von 70 erfüllten, ein minimales Signal-zu-Rauschen-Verhältnis von 3 aufweisen und deren minimale Auflösung > 400 ist (Abbildung 47) (Kapitel 3.2.5.5).

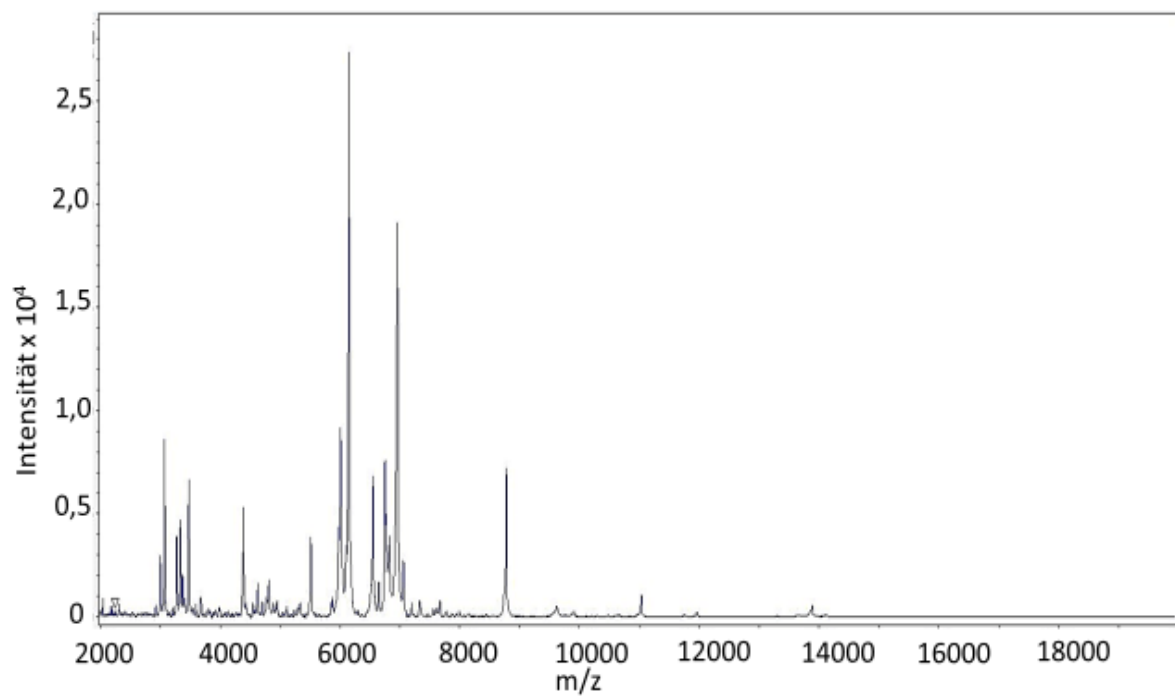


Abbildung 46: Massenspektrum für *K. psychrophila* DSM 26230 nach aerober Inkubation über 72 Stunden bei +10 °C auf Sabouraud-Agar; baseline subtracted, geglättet; Software FlexAnalysis 3.4™ (Bruker Daltoniks); m/z: Masse-zu-Ladungs-Verhältnis

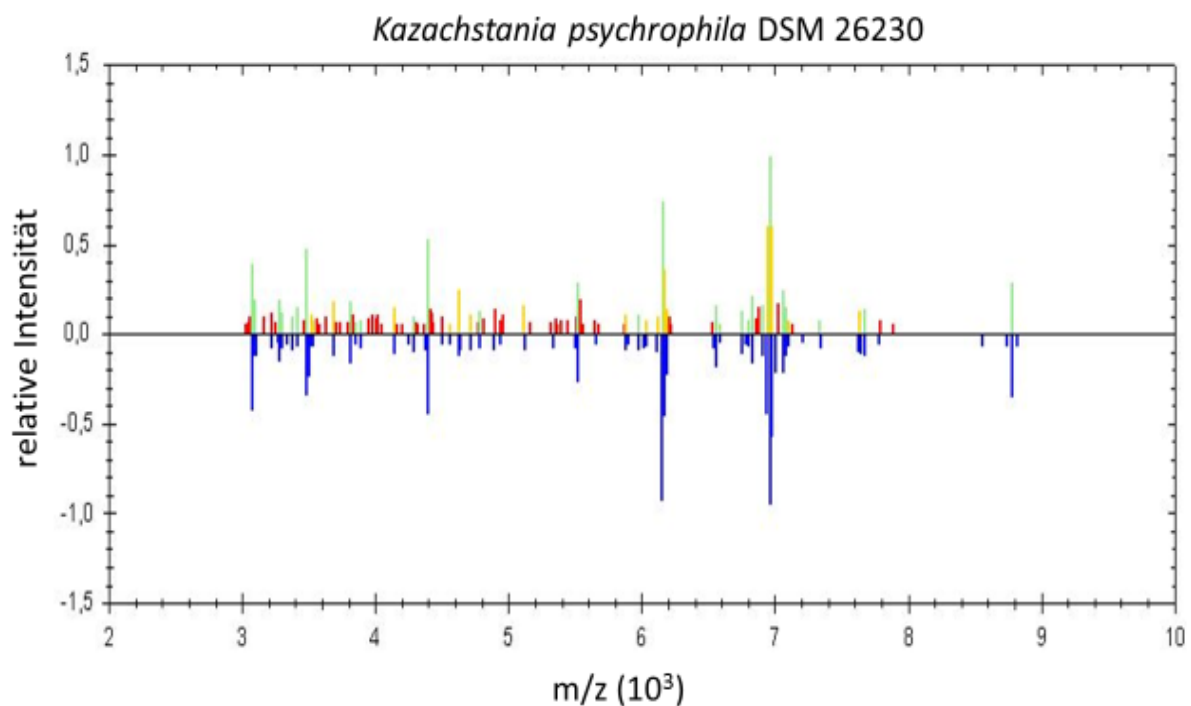


Abbildung 47: Referenzspektrum (unten) aus der Summe von 26 Einzelspektren (oben) von *K. psychrophila* DSM 26230 mit Hilfe der Software Biotyper 3.1.66 OC™ (Bruker Daltoniks). blau: Referenzmasse; grün: exakte Übereinstimmung; gelb: Abweichung der relativen Intensität; rot: keine Übereinstimmung; m/z: Masse-zu-Ladungs-Verhältnis

4.4.4 Identifikation von *K. psychrophila* mittels MALDI Biotyper

4.4.4.1 Identifikation auf Basis der Proteinextraktion

Durch den Abgleich der Massenspektren der *Kazachstania*-Referenzstämme, sowie der beiden Referenzstämme *M. frigida* DSM 4634 und *M. gelida* DSM 70882 konnte aufgrund der erstellten Referenzspektren, die auf Basis der Präparation mit Ethanol (100 %) und Ameisensäure (70 %) erstellt wurden, eine Identifizierung der genannten Spezies erfolgen. Die Referenzstämme wurden mit mittleren Score Values zwischen 2,340 und 2,729 und einer relativen Standardabweichung zwischen 1,7 und 4,9 % mittels der Software Biotyper 3.1.66 OC™ (Bruker Daltoniks) erfolgreich identifiziert (Tabelle 29).

Tabelle 29: Identifikationsreport der *Kazachstania*-Referenzstämme und *Mrakia*-Referenzstämme durch Abgleich mit den Daten plus der selbst erstellten Referenzspektren mit der Software Biotyper 3.1.66 OC™ (Bruker Daltoniks); Präparationsmethode: Proteinextraktion mit Ethanol (100 %) und Ameisensäure (70 %)

Stammnummer	MALDI-Identifizierung	mittlerer Score Value	RSD [%]
DSM 26230	<i>Kazachstania psychrophila</i>	2,340	4,0
CBS 2757	<i>Kazachstania lodderae</i>	2,533	1,8
CBS 398	<i>Kazachstania unispora</i>	2,508	1,7
CBS 4311	<i>Kazachstania servazzii</i>	2,656	2,6
DSM 4634	<i>Mrakia frigida</i>	2,324	4,9
DSM 70882	<i>Mrakia gelida</i>	2,579	4,3

DSM: Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen; CBS: Centraalbureau voor Schimmelcultures; RSD: relative Standardabweichung

Auch die Wildstämme, für die jeweils ebenfalls ein Referenzspektrum erstellt wurde, konnten daraufhin mit mittleren Score Values zwischen 2,365 und 2,774 durch das jeweilige hinterlegte Referenzspektrum identifiziert werden (Tabelle 30). Dabei kam es zu einer sicheren Identifikation der Isolate auf Speziesebene und zu keiner Fehlidentifikation mit anderen Daten der Software Biotyper 3.1 OC™ (Bruker Daltoniks). Die relative Standardabweichung bei der Identifizierung der Hefe-Isolate betrug stets $\leq 3,7\%$, sodass von einer guten Reproduzierbarkeit der erstellten Referenzspektren ausgegangen werden kann (Tabelle 30).

Tabelle 30: Identifikationsreport der Isolate durch Abgleich mit den Daten plus der selbst erstellten Referenzspektren mit der Software Biotyper 3.1.66 OC™ (Bruker Daltoniks); Präparationsmethode: Proteinextraktion mit Ethanol (100 %) und Ameisensäure (70 %)

Isolatnummer	Identifizierung	mittlerer Score Value	RSD [%]
1	<i>Kazachstania psychrophila</i>	2,645	2,0
2	<i>Kazachstania psychrophila</i>	2,475	3,0
3	<i>Kazachstania psychrophila</i>	2,704	2,7
4	<i>Kazachstania psychrophila</i>	2,745	1,5
5	<i>Kazachstania psychrophila</i>	2,435	2,6
6	<i>Kazachstania psychrophila</i>	2,483	2,7
7	<i>Kazachstania psychrophila</i>	2,468	2,6
8	<i>Kazachstania psychrophila</i>	2,751	1,1
9	<i>Kazachstania psychrophila</i>	2,372	2,6
10	<i>Kazachstania psychrophila</i>	2,390	3,3
11	<i>Kazachstania psychrophila</i>	2,486	3,7
12	<i>Kazachstania psychrophila</i>	2,477	3,0
13	<i>Kazachstania psychrophila</i>	2,366	3,4
14	<i>Kazachstania psychrophila</i>	2,556	2,2
15	<i>Kazachstania psychrophila</i>	2,615	1,6
16	<i>Kazachstania psychrophila</i>	2,744	0,8
17	<i>Kazachstania psychrophila</i>	2,365	3,4
18	<i>Kazachstania psychrophila</i>	2,762	0,9
19	<i>Kazachstania psychrophila</i>	2,578	1,8
20	<i>Kazachstania psychrophila</i>	2,774	0,9

DSM: Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen; CBS: Centraalbureau voor Schimmelcultures; RSD: relative Standardabweichung

4.4.4.2 Identifikation durch verkürzte Proteinextraktion

Durch den Abgleich mit dem erstellten Referenzspektrum für die Identifikation mit der verkürzten Proteinextraktionsmethode (YOTL) als Präparationsmethode konnte der Referenzstamm *K. psychrophila* DSM 26230 mit einem mittleren Score Value von 2,093 und einer relativen Standardabweichung von 3,8 % ebenfalls richtig identifiziert werden.

Tabelle 31: Identifikationsreport der *Kazachstania* spp. durch Abgleich mit den Daten plus der selbst erstellten Referenzspektren mit der Software Biotyper 3.1.66™ (Bruker Daltoniks); Präparationsmethode: Yeast-On-Target-Lysis (YOTL)

Isolatnummer	MALDI-Identifizierung (best match)	Score Value
DSM 26230	<i>Kazachstania psychrophila</i>	2,221
CBS 2757	<i>Kazachstania lodderae</i>	2,295
CBS 398	<i>Kazachstania unispora</i>	1,707
CBS 4311	not reliable identification	1,527
1	<i>Kazachstania psychrophila</i>	2,100
2	<i>Kazachstania psychrophila</i>	2,060
3	<i>Kazachstania psychrophila</i>	2,127
4	not reliable identification	1,601
5	<i>Kazachstania psychrophila</i>	2,429
6	<i>Kazachstania psychrophila</i>	2,428
7	<i>Kazachstania psychrophila</i>	2,236
8	<i>Kazachstania psychrophila</i>	1,954
9	<i>Kazachstania psychrophila</i>	2,014
14	<i>Kazachstania psychrophila</i>	2,190
15	<i>Kazachstania psychrophila</i>	2,418
16	<i>Kazachstania psychrophila</i>	1,705
17	not reliable identification	1,686
18	<i>Kazachstania psychrophila</i>	2,325
19	<i>Kazachstania psychrophila</i>	2,143
20	<i>Kazachstania psychrophila</i>	2,145

DSM: Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen; CBS: Centraalbureau voor Schimmelcultures; Wertebereich: $3,000 \leq 2,300$ hoch wahrscheinliche Speziesidentifikation; $2,299 \leq 2,000$ sichere Genusidentifikation, mögliche Speziesidentifikation; $1,999 \leq 1,700$ wahrscheinliche Genusidentifikation; $< 1,699$ keine verlässliche Identifikation

Eine korrekte Identifikation der Wildstämme auf Basis der YOTL konnte für 14 der 16 beprobten und mit dieser Methode untersuchten Hefe-Isolate erfolgen. Teilweise wurden niedrigere Score Values erreicht (Tabelle 31). *K. unispora* CBS 398 und zwei Wildstämme (Isolate 8; 16) konnten nur auf Genusebene identifiziert werden. Bei zwei Isolaten (Isolate 4; 17) und *K. servazzii* CBS 4311 war keine verlässliche Identifikation möglich (Tabelle 31). *K. lodderae* CBS 2757 konnte durch die YOTL ausschließlich nach einer Inkubation bei +10 °C richtig identifiziert werden, wobei dies nur einmal mit einem Score Value von 2,295 von insgesamt 12 gemessenen Spots der Fall war, was demnach einem Mittelwert von 0,459 entsprach.

Bei der visuellen Beurteilung unterschieden sich die Massenspektren der beiden Präparationsmethoden nur geringgradig voneinander (Abbildung 48). Bei der verkürzten Proteinextraktion (YOTL) stellten sich die Massen im niedrigen Massenbereich mit höheren Intensitäten dar, während im höheren Massenbereich (> 7 kDa) nur durch die unverkürzte Präparationsmethode mit Ethanol (100 %) und Ameisensäure (70 %) weitere Massen darstellbar waren (rot markierte Bereiche, Abbildung 48).

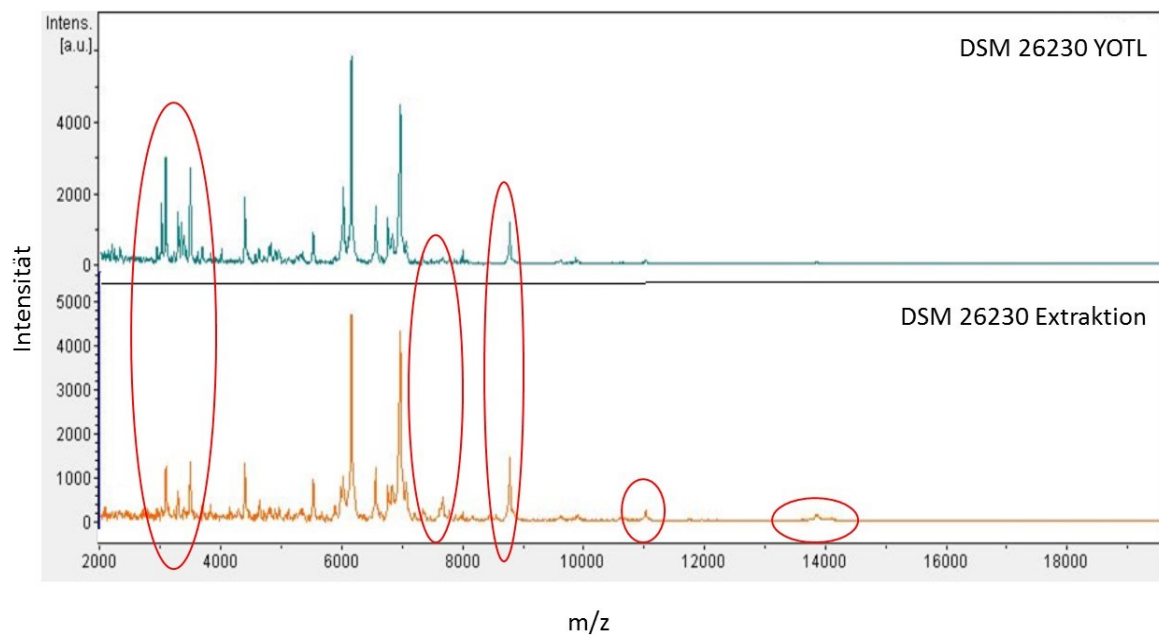


Abbildung 48: Massenspektrum für *K. psychrophila* DSM 26230 auf Basis der verkürzten Proteinextraktion (YOTL, oben) und der Proteinextraktion mit Ethanol (100 %) und Ameisensäure (70 %) (unten); rot markierte Bereiche: höhere Intensität im niedrigen Massenbereich bei der verkürzten Proteinextraktionsmethode, im höheren Massenbereich hingegen stärkere Intensitäten bei der unverkürzten Proteinextraktion; baseline subtracted, geglättet, Software FlexAnalysis 3.1TM (Bruker Daltoniks)

4.4.5 Spezifitätsprüfung für das *K. psychrophila* DSM 26230-Referenzspektrum

In der Spezifitätsprüfung kam es durch den automatisierten Softwareabgleich (Biotyper 3.1.66 OC™, Bruker Daltoniks) zu keinen Fehlidentifikationen innerhalb der Gattung *Kazachstania*. Ebenso war eine eindeutige Differenzierung der erstellten Referenzspektren auf Speziesebene möglich. In Abbildung 49 ist ein mit Hilfe der Software Biotyper 3.1.66 OC™ (Bruker Daltoniks) erstelltes MSP-Dendrogramm dargestellt, wodurch die Ähnlichkeiten der in der Datenbank enthaltenen *Kazachstania* spp. miteinander abgeglichen wurden. Die X-Achse des Dendrogramms entspricht dem relativen Distanz-Level, welches dem nicht-logarithmischen Score Value entspricht:

- Log 1000 = Score Value 3,000: maximal verschiedene Spezies
- Log 500 = Score Value 2,699
- Log 0 = keine Unterscheidung

Die mit * gekennzeichneten Spezies sind in der aktuellen Version der Datenbank (3.1.66) nicht enthalten und wurden im Rahmen dieser Arbeit erstellt (Kapitel 3.2.5.5), wobei *K. lodderae* CBS 2757 während der Studie in die Datenbank im Zuge eines Softwareupdates durch den Hersteller aufgenommen wurde. *E. coli* DSM 682 wurde aus der Taxonomie-Datenbank (Bruker Daltoniks) als außenstehende Spezies hinzugefügt und unterschied sich mit einem maximalen Score Value von 3,0 (log 1000) von den Referenzspektren der *Kazachstania*-Spezies.

K. servazzii CBS 4311 bildete ein gemeinsames Cluster mit den Spezies *K. telluris* und *K. pintolopesii* CBS 3025 (lila), welches sich mit einem LogScore von 0,489 (Score Value 2,511) von den anderen *Kazachstania*-Spezies unterschied.

Ein weiteres Cluster bildete *K. sinensis* CBS 7660T mit *K. transvaalensis* CBS 2186T und *K. africana* CBS 2751T (hellblau, Abbildung 49). Sie unterschieden sich mit einem Score Value von 2,856 (log 717) zu den anderen *Kazachstania* spp. Weiterhin besteht eine Clusterbildung von *K. kunashirensis* CBS 7662 mit *K. psychrophila* DSM 26230, *K. lodderae* CBS 2757 und *K. exigua* CBS 6440 (hellgrün), wobei *K. psychrophila* DSM 26230 mit *K. lodderae* CBS 2757 ein gemeinsames Cluster bildeten, was den hohen genetischen Verwandtschaftsgrad auch auf massenspektrometrischer Ebene widerspiegelt (Abbildung 49). Sie unterschieden sich mit einem Score Value von 0,473 (log 336,3) voneinander und mit einem Score Value von 0,364 (log 432,5) zu *K. exigua* CBS 6440. Zu *K. kunashirensis* CBS 7662 bestand eine Unterscheidung

mit einem Score Value von 0,208. Eine weitere Unterteilung entstand durch das rote Cluster von *K. spencorum* CBS 3019 mit *K. unispora*, das sich mit einem Score Value von 0,202 von den anderen *Kazachstania* spp. abgrenzen ließ (Abbildung 49).

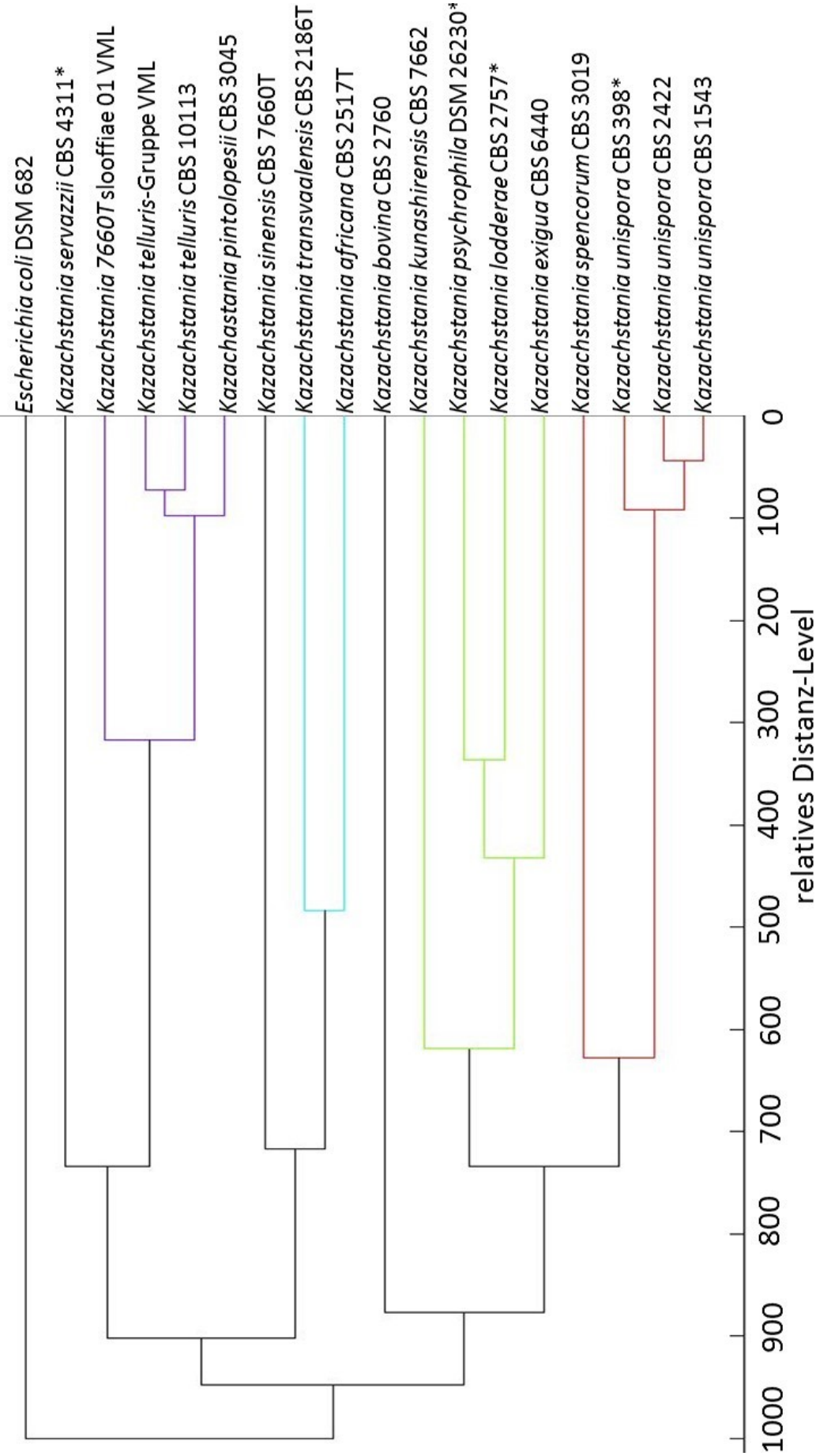


Abbildung 49: MSP-Dendrogramm für die in der Datenbank Biotyper 3.1.66 OC™ (Bruker Daltoniks) enthaltenen *Kazachstania* spp.; *: selbst erstellte Referenzspektren; *Escherichia coli* DSM 682 als außenstehende Spezies

Tabelle 32: Identifikationsreport der Spezifitätsprüfung, Biotyper 3.1.66 OC™ (Bruker Daltoniks): Identifizierung aus Fleisch isolierter Hefen

Analyt (Paniora, 2014)	Isolatbezeichnung	Kategorie	MALDI-Identifizierung (best match)
<i>B. albus</i>	RD-AR.8.4.3	C	NRI
<i>C. sake</i>	RD-FR.2.1.5	C	NRI
<i>C. sake</i>	RD-DE.4.1.3	C	NRI
<i>C. sake</i>	LA-IE.5.9.3	A	<i>C. zeylanoides</i>
<i>C. sake</i>	RD-US.1.2.3	A	<i>Hafnia alvei</i>
<i>C. zeylanoides</i>	RD-UR.1.1.3	A	<i>C. zeylanoides</i>
<i>C. zeylanoides</i>	LA-DE.8.4.4	A	<i>C. zeylanoides</i>
<i>C. zeylanoides</i>	LA-DE.5.1.3	A	<i>C. zeylanoides</i>
<i>C. zeylanoides</i>	RD-IE.3.1.4	B	<i>C. zeylanoides</i>
<i>C. zeylanoides</i>	RD-AR.8.1.5	A	<i>C. zeylanoides</i>
<i>Cr. curvatus</i>	RD-DE.11.1.4	C	NRI
<i>Cr. curvatus</i>	LA-IE.5.10.4	C	NRI
<i>Cr. curvatus</i>	LA-WA-1.2.3	B	<i>Cr. curvatus</i>
<i>Fungal sp.</i>	LA-WA-5.1.3	B	<i>C. lipolytica</i> (ana) / <i>Yarrowia lipolytica</i> (teleo)
<i>Fungal sp.</i>	RD-NZ.8.3.2	B	<i>C. lipolytica</i> (ana) / <i>Yarrowia lipolytica</i> (teleo)
<i>M. frigida</i>	DSM 4634	C	NRI
<i>M. gelida</i>	DSM 70882	C	NRI
<i>Rh. glutinis</i>	RD-IE.3.2.0	C	NRI
<i>Rh. mucilaginosa</i>	LA-IE.5.8.6	A	<i>Rh. mucilaginosa</i>
<i>Rh. mucilaginosa</i>	2014/152-1019.3	C	NRI
<i>Rhodotorula spp.</i>	2014/152-1016.4	B	<i>Sporobolomyces roseus</i>
<i>W. anomalus</i>	RD-NL.2.2.3	A	<i>C. pelliculosa</i> (ana) / <i>Pichia anomala</i> (teleo)

A: sichere Speziesidentifikation; B: sichere Genusidentifikation; C: keine sichere Identifikation; NRI: keine verlässliche Identifikation B.: *Bulleromyces*; C.: *Candida*; Cr.: *Cryptococcus*; M.: *Mrakia*; Rh.: *Rhodotorula*; W.: *Wickerhamomyces*; ana: *anamorph*; teleo: *teleomorph*

Bei der Überprüfung des erstellten Summenspektrums mit Hefen anderer Gattungen (Tabelle 9, Kapitel 3.1.2) kam es zu keiner Fehlidentifikation von *K. psychrophila* DSM 26230 (Tabelle 32). Das Isolat LA-IE-5.9.3, das laut ITS-Sequenzanalyse der Spezies *C. sake* angehören sollte (Paniora, 2014), wurde mit einem Score Value von 2,128 als *C. zeylanoides* identifiziert. Isolat RD-US.1.2.3 wurde mittels der MALDI-TOF-MS mit hoher Wahrscheinlichkeit (Score Value 2,412) als *Hafnia alvei* identifiziert. Zwei der drei *Cr. curvatus*-Isolate konnten mittels der MALDI-TOF-MS nicht identifiziert werden, das dritte Isolat (LA-WA-1.2.3) wurde richtig auf Gattungsebene identifiziert (Score Value 1,975). Die beiden Isolate, für die durch die Sequenzanalyse der ITS-Region lediglich eine Zuordnung zu der Gattung *Fungal* sp. möglich war, wurden mit einem Score Value von 1,775 bzw. 1,741 auf Gattungsebene als *C. lipolytica* identifiziert. *M. frigida* DSM 4634, *M. gelida* DSM 70882 und *Rh. glutinis* konnten aufgrund fehlender Referenzdaten in der verwendeten Datenbank Biotyper 3.1.66 OC™ (Bruker Daltoniks) nicht identifiziert werden. Insgesamt traf dies auf neun der getesteten Isolate zu (Tabelle 32).

4.4.6 Massenspektrometrischer Vergleich der *Kazachstania*-Referenzstämme

Für die vergleichende Darstellung der Massenspektren wurde unter anderem die Software ClinProTools 3.0™ (Bruker Daltoniks) auf Basis der Standardeinstellungen verwendet. Ein Farbumschlag der Banden von blau in Richtung rot bedeutet einen Anstieg der Intensität einer Masse. *K. servazzii* CBS 4311 und *K. unispora* CBS 398 wiesen eindeutig unterschiedliche Fingerprints auf, während das massenspektrometrische Bild der genetisch eng verwandten Spezies *K. lodderae* und *K. psychrophila* ähnlich erschien. In der höher kontrastierten Ansicht der Pseudogeldarstellung treten vor allem Massen hoher Intensität in den Vordergrund (Abbildung 50). *K. psychrophila* und *K. lodderae* wiesen hier ein ähnliches Muster der Massenverteilung auf, Unterschiede waren jedoch v.a. im Bereich von 6 bis 7 kDa erkennbar (gelbe Markierung).

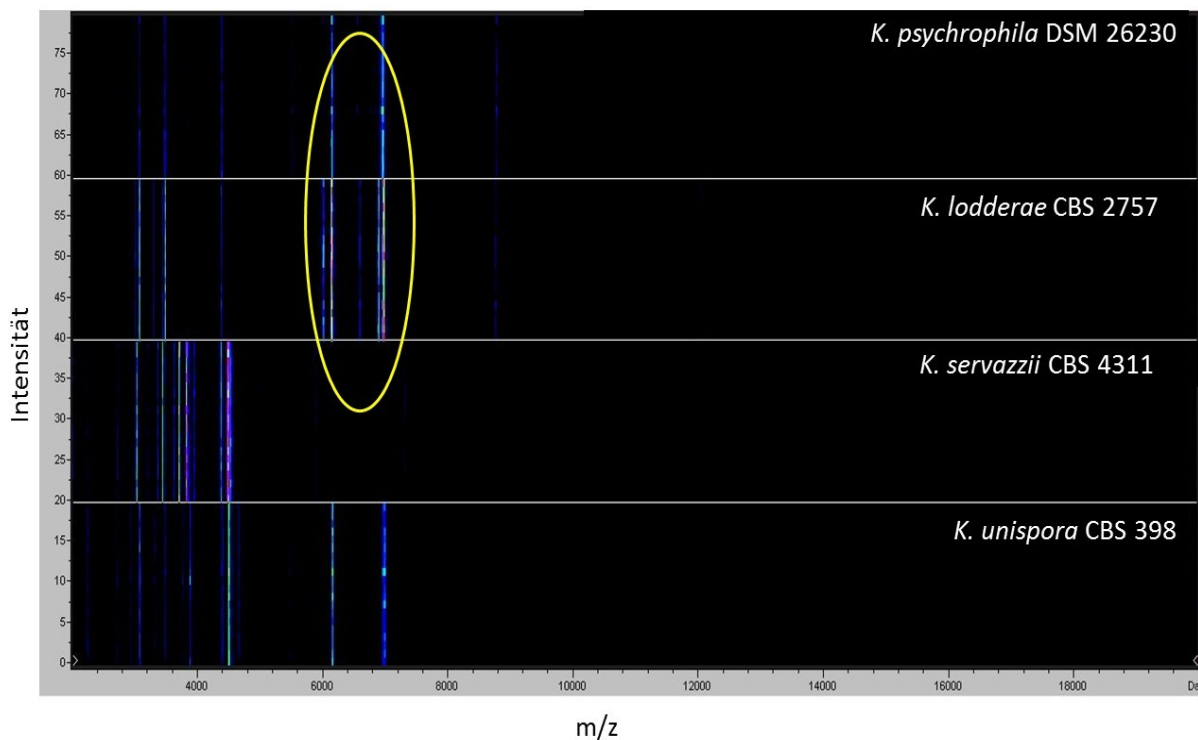


Abbildung 50: Vergleichende Darstellung der Massen der *Kazachstania* (K.)-Referenzstämme; gelbe Markierung: unterschiedliche Massen von *K. psychrophila* DSM 26230 und *K. lodderae* CBS 2757; Software ClinProTools 3.0™ (Bruker Daltoniks); DSM: Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen; CBS: Centraalbureau voor Schimmelcultures; m/z: Masse-zu-Ladung-Verhältnis

Dies konnte in einer tabellarischen Gegenüberstellung der Massen von *K. psychrophila* DSM 26230 und *K. lodderae* CBS 2757 bestätigt werden. In Tabelle 33 werden die Massen dargestellt, die spezifisch für *K. lodderae* CBS 2757 bzw. *K. psychrophila* DSM 26230 sind, d.h. Massen, die im Spektrum der jeweils anderen Spezies nicht vorkommen. Die Werte der Tabelle entsprechen der Auswertung von Abbildung 50. Speziespezifische Massen traten für *K. lodderae* CBS 2757 im Massenbereich von 3297 Da bis 3447 Da mit Intensitäten von 16,6 % bzw. 18,0 % auf, wohingegen *K. psychrophila* DSM 26230 bei 3277 Da eine Masse gleichartiger Intensität (15,3 %) aufwies. Eine weitere charakteristische Masse war für *K. psychrophila* DSM 26230 im Vergleich mit *K. lodderae* CBS 2757 bei 5520 Da zu erkennen, da diese Masse mit einer Intensität von 26,4 % die Intensität (5,2 %) der Masse im ähnlichen Massenbereich von *K. lodderae* CBS 2757 (5483 Da) stark überstieg. Dagegen fanden sich im Massenbereich zwischen 6014 Da bis 6896 Da für *K. lodderae* CBS 2757 Massen hoher Intensitäten (18,4 – 100 %), die dem Massenspektrum von *K. psychrophila* DSM 26230 nicht entsprachen. Für eine ausführliche Darstellung mit einer Gegenüberstellung aller enthaltenen Massen der beiden Spezies wird an dieser Stelle auf das Kapitel 11.2.5 verwiesen.

Tabelle 33: Massenunterschiede von *K. lodderae* CBS 2757 und *K. psychrophila* DSM 26230

<i>K. lodderae</i> CBS 2757		<i>K. psychrophila</i> DSM 26230	
Masse [Da]	Intensität [%]	Masse [Da]	Intensität [%]
3297	16,6	3277	15,3
3338	5,6	3372	8,2
3447	18,0	5520	26,4
5451	5,3	6555	17,8
5483	5,2	6752	10,9
6014	27,6		
6150	100,0		
6596	18,4		
6896	37,0		

CBS: Centraalbureau voor Schimmelcultures; Da: Dalton; DSM: Deutsche Stammsammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen; Da: Dalton

4.4.7 Vergleich der psychrophilen Referenzstämme

Damit ein massenspektrometrischer Vergleich der psychrophilen Hefe-Spezies erfolgen konnte, wurden zunächst Referenzspektren für *Mrakia* spp. nach vorgegebenen Kriterien (Kapitel 3.2.5.5) erstellt (Abbildung 51 und Abbildung 52). Abbildung 53 zeigt ein mit Hilfe der Software Biotyper 3.1.66 OC™ (Bruker Daltoniks) erstelltes MSP-Dendrogramm, wodurch die Ähnlichkeiten der Referenzspektren zwischen *K. psychrophila* und den beiden *Mrakia*-Spezies miteinander abgeglichen wurden. Durch den Abgleich wurde deutlich, dass sich die Massenspektren von *M. gelida* DSM 70882 und *M. frigida* DSM 4634 mit einem Score Value von 3,000 (log 1000) von den Massenspektren von *K. psychrophila* zu 100 Prozent unterschieden. Der Aufzweigenswert zur Unterscheidung der beiden *Mrakia* spp. (rotes Cluster) wurde mit einem log-Score von 500,3 angegeben, was einem Score Value von 2,699 entsprach. Die *K. psychrophila*-Isolate befanden sich um den log-Score nahe 0 und können durch die Software kaum unterschieden werden (blaues Cluster). Durch den Vergleich der jeweiligen Massenlisten von *K. psychrophila* DSM 26230, *M. frigida* DSM 4634 und *M. gelida* DSM 70882 konnten insgesamt drei gemeinsame Massen (3094/95 Da, 3277 Da, 3482 Da) zwischen *K. psychrophila* und *Mrakia* spp. herausgefiltert werden (Tabelle 39, Kapitel 11.2.5).

Dabei unterschieden sich die jeweiligen Massen in ihren relativen Intensitäten (Tabelle 34). Beispielsweise weist im Spektrum von *M. gelida* die Masse bei 3095 Da eine relative Intensität von 58,4 % auf, während dieselbe Masse im Spektrum von *M. frigida* mit einer relativen Intensität von 5,1 % messbar war. *K. psychrophila* wies in diesem Massenbereich eine relative Intensität von 12,3 % auf. Ähnliche relative Intensitäten für alle drei Spezies waren im Massenbereich von 3277 Da messbar (15,3 %, 25,0 %, 17,9 %). Bei 3482 Da war für *K. psychrophila* und *M. gelida* eine gemeinsame Masse festzustellen, die jedoch wiederum eine starke Abweichung in ihrer jeweiligen Intensität aufwies (33,4 % bzw. 4,1 %) (Tabelle 34). Zwischen *M. frigida* und *M. gelida* konnten insgesamt sechs gemeinsame Massen festgestellt werden (Tabelle 34).

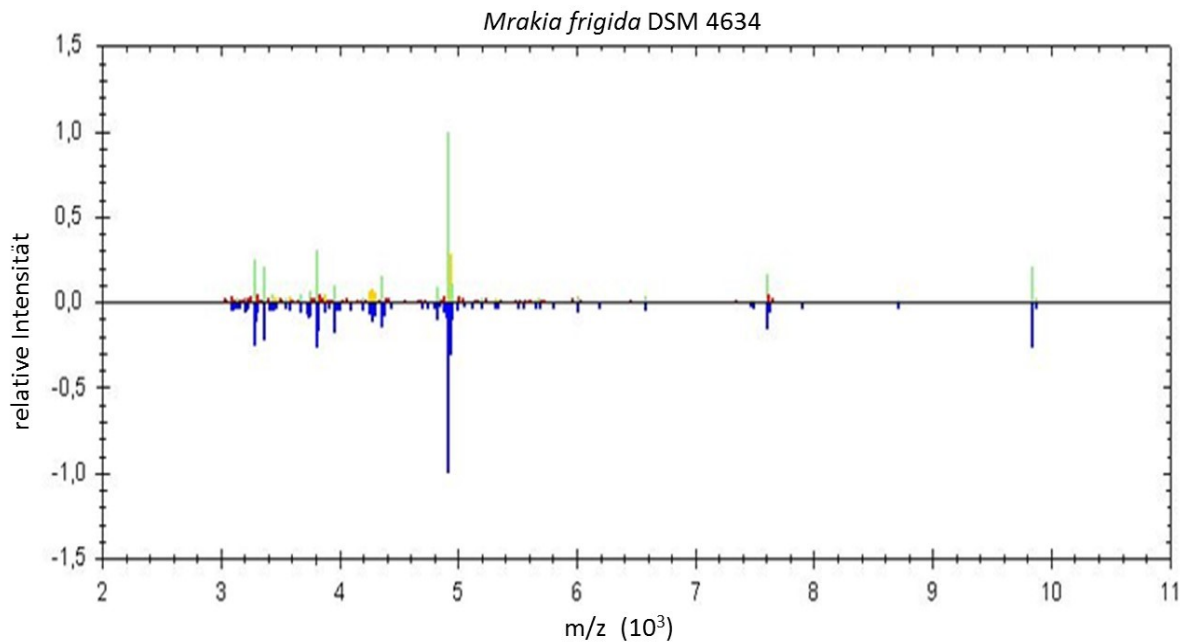


Abbildung 51: Summenspektrum für *M. frigida* DSM 4634 (blau) generiert aus insgesamt 20 Einzelspektren (bunt); grün: exakte Übereinstimmung zur Referenzmasse; gelb: Abweichung in relativer Intensität; rot: keine Übereinstimmung; Software Biotyper 3.1.66 OC™ (Bruker Daltoniks); m/z: Masse-zu-Ladung-Verhältnis

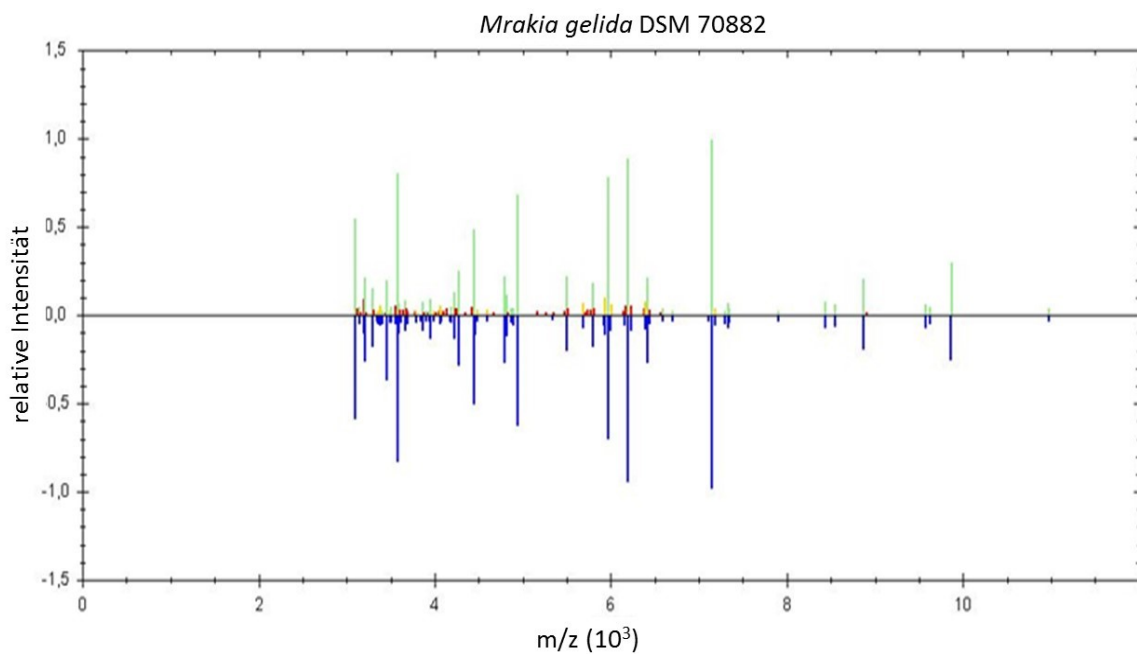


Abbildung 52: Summenspektrum für *M. gelida* DSM 70882 (blau) aus insgesamt 20 Einzelspektren (bunt); grün: exakte Übereinstimmung zur Referenzmasse; gelb: Abweichung in relativer Intensität; rot: keine Übereinstimmung; Software Biotyper 3.1.66 OC™ (Bruker Daltoniks); m/z: Masse-zu-Ladung-Verhältnis

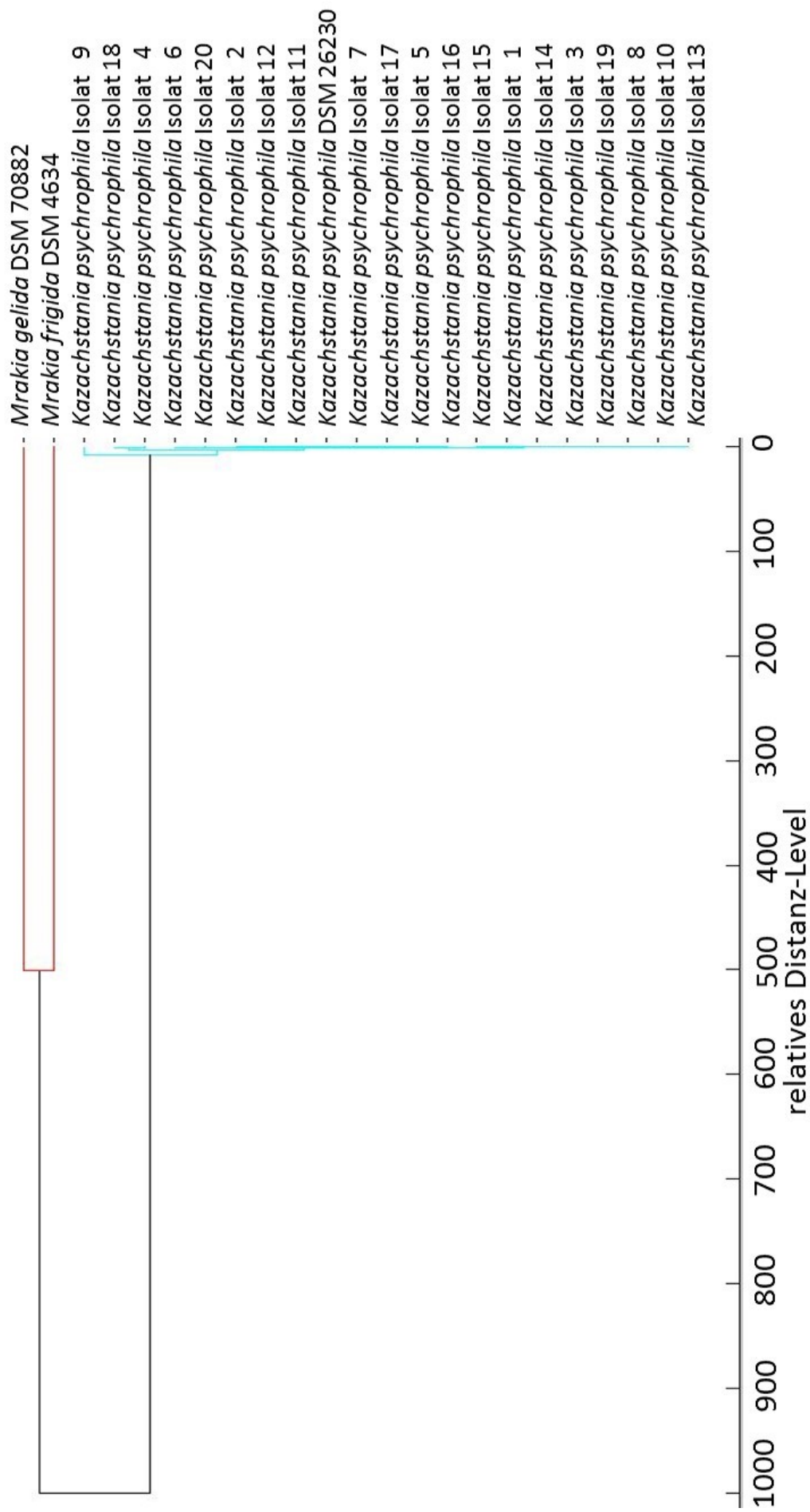


Abbildung 53: MSP-Dendrogramm für die Summenspektren von *M. gelida* DSM 70882, *M. frigida* DSM 4634, *K. psychrophila* DSM 26230 und den psychrophilen Wildstämmen; Software Biotyper 3.1.66 OC™ (Bruker Daltoniks)

Tabelle 34: Gemeinsame Massen der psychrophilen Hefen *K. psychrophila* DSM 26230, *M. frigida* DSM 4634 und *M. gelida* DSM 70882

<i>K. psychrophila</i> DSM 26230		<i>M. frigida</i> DSM 4634		<i>M. gelida</i> DSM 70882	
Masse [Da]	Intensität [%]	Masse [Da]	Intensität [%]	Masse [Da]	Intensität[%]
3094	12,3	3095	5,1	3095	58,4
3277	15,3	3277	25,0	3287	17,9
-	-	3951	17,9	3950	13,1
-	-	3443	4,1	3443	36,6
3482	33,4	-	-	3481	4,1
-	-	3951	17,9	3950	13,1
-	-	4931	30,5	4931	63,0

DSM: Deutsche Stammsammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen; Da: Dalton; -: keine vergleichbare Masse; *K.*: *Kazachstania*; *M.*: *Mrakia*

4.4.8 Vergleich der Wildstämme aus frischen und aus verdorbenen Fleischproben

Im MSP-Dendrogramm (Biotyper 3.1.66 OC™) kam es zur Bildung von zwei großen Clustern (Abbildung 54). Im ersten Cluster, das sich mit einem Score Value von 3,000 vom zweiten Cluster unterschied, bildeten die Isolate 6 und 11 (grün), sowie die Isolate 5, 9, 12 und 13 jeweils ein gemeinsames Untercluster (rot). Diese Isolate waren verdorbenen Fleischproben zuzuordnen und gehörten den biochemischen Gruppen B, C, D und E an (Abbildung 34, Kapitel 4.2.2.).

Das zweite Cluster (dunkelblau) bildete *K. psychrophila* DSM 26230 mit den übrigen Hefe-Isolaten aus frischen und verdorbenen Fleischproben. Der Unterscheidungswert der Wildstämme aus frischen und verdorbenen Fleischproben zum Referenzstamm wurde mit einem Score Value von 2,356 (log 227,4) ermittelt, was einem Unterscheidungswert von 0,64 der Hefe-Isolate zum Referenzstamm entspricht.

Die Isolate 8, 14, 15 und 19 konnten anhand ihres Massenspektrums nicht voneinander unterschieden werden (log 0). Sie bildeten ein Cluster gemeinsam mit den Isolaten 1, 3, 16 und 18, die jeweils aus frischem (16, 18) und aus verdorbenem (1, 3) Fleisch stammten. Gemeinsam mit Isolat 20 unterschieden sie sich mit einem Score Value von 1,6 (log 39,6). Sie bildeten gemeinsam mit den Isolaten 2, 4, 7 und 17 eine große Untergruppe gegenüber Isolat 10 mit einem ermittelten Score Value von 1,9 (log 79,1).

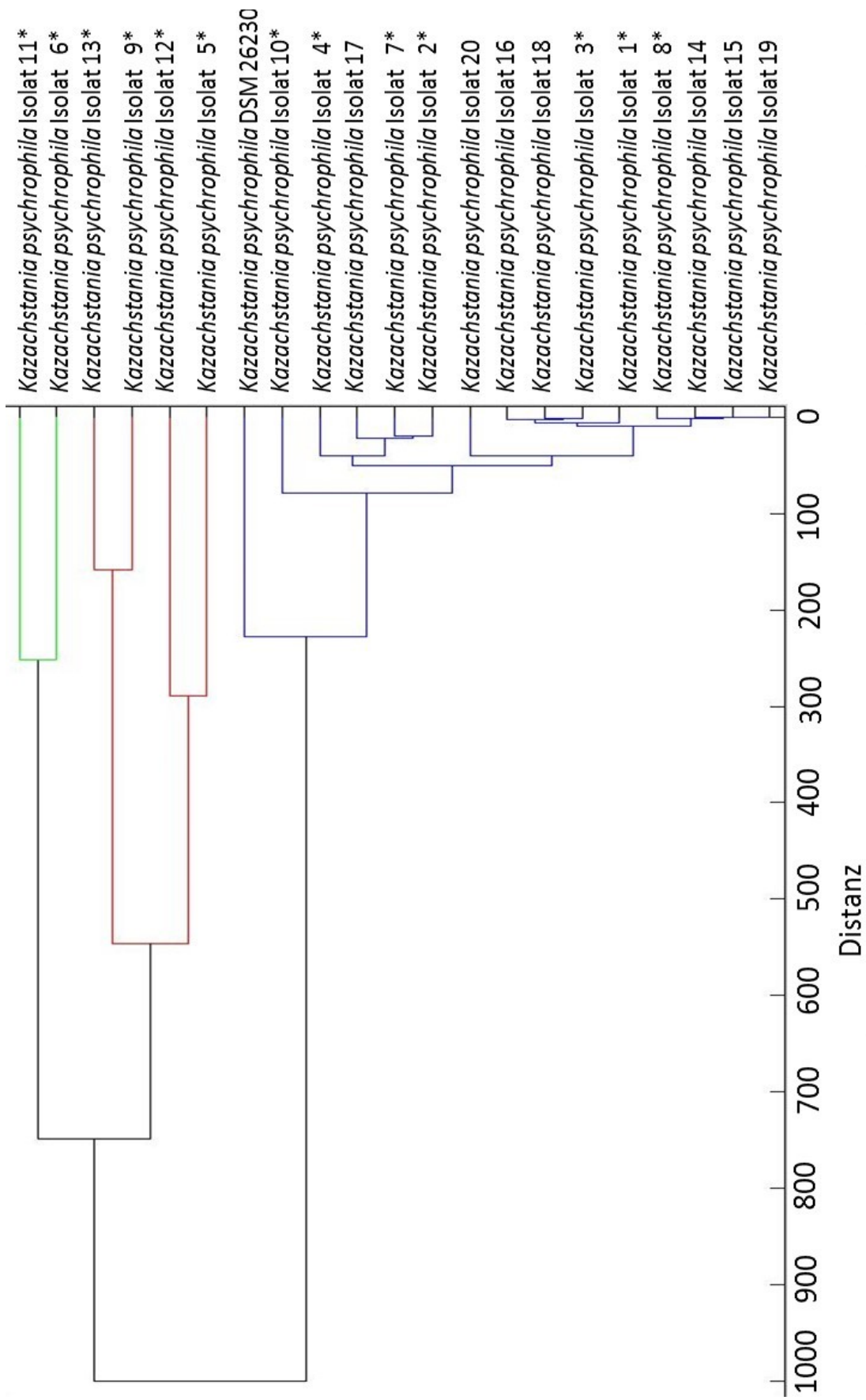


Abbildung 54: MSP-Dendrogramm für die Summenspektren von *K. psychrophila* DSM 26230 und den Hefe-Isolaten aus frischen und verdorbenen (*) Fleischproben; Software Biotyper 3.1.66 OC™ (Bruker Daltoniks)

Im Pseudogeldiagramm (ClinProTools 3.0™, Bruker Daltoniks) konnten bei der Gegenüberstellung der Massenspektren aus frischen und aus verdorbenen Fleischproben unterschiedliche Intensitäten im Massenbereich von 6150 bis 6970 Da festgestellt werden (Abbildung 55, rote Markierung).

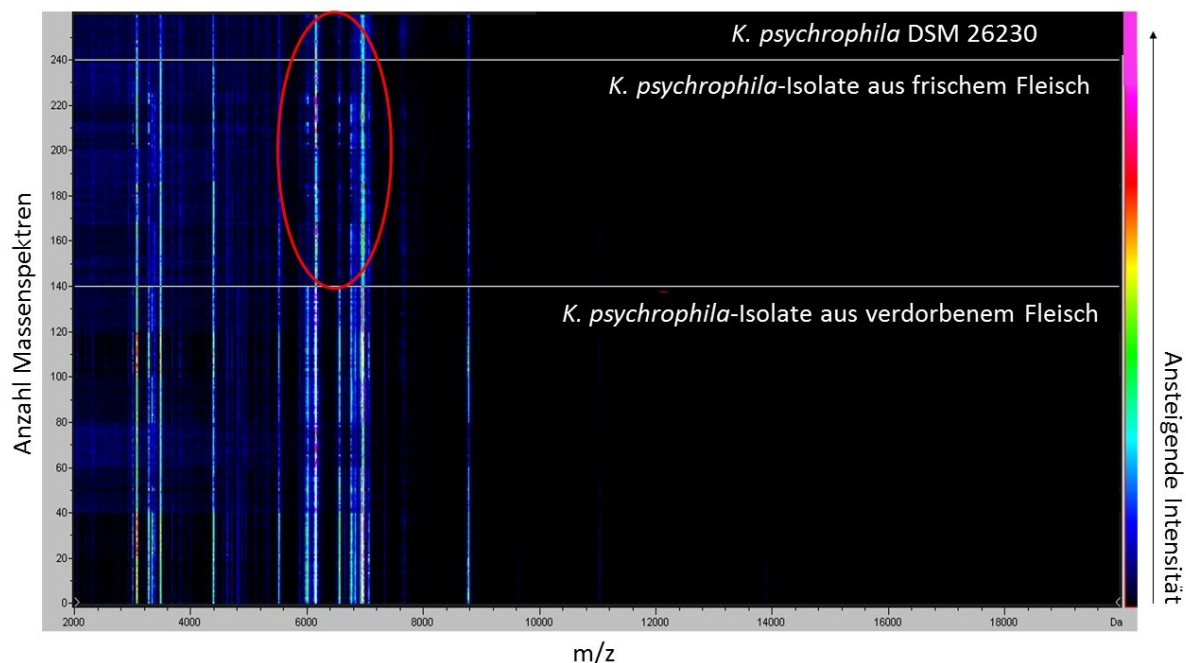


Abbildung 55: Massenvergleich aller *Kazachstania* (*K.*) *psychrophila*-Isolate aus frischem vakuumverpacktem Fleisch (rote Markierung: niedrigere Intensitäten) mit den Isolaten aus verdorbenem vakuumverpacktem Fleisch und dem Referenzstamm; Software ClinProTools 3.0™ (Bruker Daltoniks); m/z: Masse-zu-Ladung-Verhältnis; DSM: Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen

Dies äußerte sich in geringeren relativen Intensitäten bei der Isolatgruppe aus frischem Fleisch (n=7), im Vergleich zur Isolatgruppe aus verdorbenem Fleisch (n=13) (Tabelle 35).

Tabelle 35: Unterschiede der relativen Intensitäten der Isolate aus frischen und aus verdorbenen Fleischproben im Massenbereich von 6150 – 6970 Da

Masse [Da]	relative Intensität verdorben [%]*	relative Intensität frisch [%]*
6150	> 50 %	> 50 %
6751	20	5
6830	15	2-5
6960	50 – 70	30

* ermittelt durch ClinProTools 3.0™ (Bruker Daltoniks); Da: Dalton

4.5 Zusammenfassung der Ergebnisse

Der molekularbiologische Abgleich der 26S rDNA Gensequenzen der untersuchten Wildstämme mit der NCBI-Datenbank ermöglichte eine sichere Identifikation auf Speziesebene. Alle untersuchten psychrophilen Hefe-Isolate aus den vakuumverpackten Fleischproben waren zu 99 % *K. psychrophila* zuordenbar. Dabei stammte die Mehrzahl der Isolate (n=13) aus verdorbenen Rindfleischproben. Sieben Isolate wurden aus frischem vakuumverpacktem Fleisch (6 Isolate aus Rindfleisch, 1 Isolat aus Lammfleisch) isoliert, welches keine Verderbsanzeichen aufwies.

Die *Kazachstania*-Referenzstämme konnten rein koloniemorphologisch auf verschiedenen Nährmedien kaum voneinander unterschieden werden. Dennoch zeigten sich für *K. lodderae* CBS 2757 in Abhängigkeit von der Inkubationstemperatur phänotypische Unterschiede, da für die Hefe bei einer Inkubationstemperatur von +20 °C ein eisblumenartiges Wachstum der Einzelkolonien festgestellt werden konnte. Jedoch trat dies bei den weiteren getesteten Inkubationstemperaturen nicht in Erscheinung. Auch für die anderen Stämme konnte dies nicht beobachtet werden. Eine lichtmikroskopische Differenzierung der Spezies *K. psychrophila* DSM 26230 von anderen *Kazachstania* spp. war aufgrund der typischen schmalen, ellipsoiden Hefezellform im Vergleich zu den verglichenen *Kazachstania*-Referenzstämmen möglich.

Für insgesamt 20 Wildstämme konnte eine Psychrophilie bestätigt werden. Die morphologische Erscheinungsform der untersuchten Hefen äußerte sich im Allgemeinen durch weiße bis cremefarbene Einzelkolonien mit glatter Oberfläche und glatten Rändern, sowie cremiger Textur. Trotzdem konnten phänotypische Unterschiede beobachtet werden. Beispielsweise wurden geringgradige Variationen in Bezug auf die Oberflächenbeschaffenheit und die Erhebung der Einzelkolonien beobachtet. Die Isolate 1, 4 und 17 wiesen auf MEA⁺ eine perlmuttartig glänzende Oberfläche auf und das Isolat 5 unterschied sich in seinem Wachstum auf MEA⁺ durch kugelförmige Einzelkolonien, wohingegen die Mehrzahl der Isolate halbkugelförmige Kolonien bildete. Dies konnte jedoch auch in Abhängigkeit des Nährmediums variieren.

Weiterhin fiel nach acht Wochen eine Lappung der Ränder bei zwei Isolaten auf (Isolate 4 und 17). Isolat 4 wurde aus verdorbenem Rindfleisch mit Ursprung aus Deutschland und das Isolat 17 aus frischem, vakuumverpacktem Rindfleisch aus Argentinien isoliert.

Auch in der lichtmikroskopischen Untersuchung der Hefe-Isolate konnten leichte Unterschiede in der Zellmorphologie beobachtet werden, wobei sich diese bereits auf die Verwendung unterschiedlicher Nährmedien bei demselben Isolat zurückführen lassen konnten. Eine überwiegend rund-ovale Zellform war allerdings immer zu verzeichnen. Insbesondere bei den Isolaten 4 und 9 konnten häufiger birnenförmige Zellen beobachtet werden. Auf MEA⁺ kam es nach sieben Tagen Inkubation bei +10 °C bei einigen Isolaten zur Ausbildung von Pseudohyphen. Dies wurde auch für den Referenzstamm DSM 26230 beschrieben (Kabisch *et al.*, 2013). Bei der Anzucht auf den anderen Nährmedien war dies nicht der Fall.

Auch die Erscheinungsform der Ascosporen veränderte sich innerhalb eines Isolates in Abhängigkeit des Nährmediums. Bei Isolat 6 konnten auf Blutagar teilweise bis zu vier Ascosporen innerhalb eines Ascus beobachtet werden, wohingegen auf den hefespezifischen Nährmedien eine ungeschlechtliche Fortpflanzung durch unipolare Knospung zu verzeichnen war.

In der biochemischen Untersuchung verhielt sich die Mehrzahl der Isolate (Gruppe A) identisch zum Referenzstamm DSM 26230. Trotzdem ergaben sich im Reaktionsprofil unter den Isolaten leichte Unterschiede (Gruppen A–G). Eine Korrelation des morphologischen Erscheinungsbildes und der biochemischen Eigenschaften konnte nur teilweise nachgewiesen werden. Isolat 5 unterschied sich morphologisch in vielen Fällen ebenso von den restlichen Isolaten, wie in der biochemischen Untersuchung. Im Vergleich wurde für dieses Isolat eine Positivreaktion für D-Xylose nachgewiesen. Eine morphologische Unterscheidung wurde ebenfalls für Isolat 4 beobachtet, wohingegen sich dieses biochemisch nicht von der Mehrzahl aller untersuchten Isolate unterschied. Die beiden Isolate (4 und 17) mit morphologisch gelappten Rändern konnten ebenfalls der biochemischen Gruppe A zugeordnet werden. Eine Unterscheidung der Hefe-Isolate aus frischen und verdorbenen Fleischproben war anhand der morphologischen und biochemischen Untersuchungen nicht möglich (Tabelle 36).

Tabelle 36: Darstellung der Beziehungen biochemischer Gruppen zum Isolatursprung

Biochemische Gruppeneinteilung	Herkunft der Proben			Gesamt
	Verdorbene Proben	Frische Proben	Land	
Gruppe A	6	4	DE; ARG; AUS	10
Gruppe B	1	0	DE	1
Gruppe C	1	1	DE	2
Gruppe D	3	0	DE	3
Gruppe E	2	0	DE	2
Gruppe F	0	1	DE	1
Gruppe G	0	1	AUS	1
Summe	13	7		20

AUS: Australien; ARG: Argentinien; DE: Deutschland

In den massenspektrometrischen Untersuchungen führte die Kultivierung von *K. psychrophila* auf CBA zu einer Divergenz des Fingerprints im Vergleich zur Anzucht auf hefespezifischen Nährmedien (GYP-Agar, SAB-Agar, MEA⁺, YGC-Agar). Die Messungen von CBA ergaben im Fingerprint einen reproduzierbaren Peak (in 70 % der Messungen) bei 2074 Da mit einer mittleren Intensität von 735, der bei keinem der anderen hefespezifischen Nährmedien nachweisbar war. Weiterhin kam es bei 3340 Da verglichen mit den Spektren der anderen Nährmedien zu einer erhöhten Intensität des Peaks. Auswirkungen auf die Identifizierbarkeit hatten die Abweichungen im Massenspektrum von CBA jedoch nicht, da die Identifizierung mit einem mittleren Score Value von 2,338 als erfolgreich beurteilt werden konnte.

Die Erzeugung von Massenspektren guter Qualität für *K. lodderae* CBS 2757 konnte durch eine Verkürzung der Kultivierungsdauer von 48 Stunden auf 12 Stunden bei +25 °C erreicht werden. Dadurch wurde die mittlere Anzahl an Peaks, die einem minimalen S/N-Verhältnis von 3 entsprachen, von durchschnittlich 7 auf 69,1 Peaks gesteigert. Ähnliche Ergebnisse wurden durch die Reduktion der Kultivierungstemperatur von +25 °C auf +10 °C erreicht. Die durchschnittliche Anzahl verwertbarer Peaks betrug hier 52,8. Der hohe genetische Verwandtschaftsgrad von *K. psychrophila* DSM 26230 und *K. lodderae* CBS 2757 spiegelte sich in einem ähnlichen massenspektrometrischen Erscheinungsbild wider. Trotzdem war eine Unterscheidung insbesondere im höheren Massenbereich von *K. psychrophila* möglich (Tabelle 37). Der Vergleich von *K. psychrophila* mit den psychrophilen Spezies *M. frigida* DSM 4634 und *M. gelida* DSM 70882 zeigte eine deutliche Divergenz der massenspektrometrischen Fingerprints, sodass eine sichere Unterscheidung (Score Value 3,0)

der psychrophilen Hefen durch die MALDI-TOF-MS gegeben ist. Jedoch konnten insgesamt drei Massen im Bereich von 3095 Da, 3277 Da und 3482 Da für alle drei Spezies festgestellt werden. Die Massen im Bereich 3095 Da und 3482 Da unterschieden sich hinsichtlich ihrer relativen Intensitäten. Die Masse bei 3277 Da wies jedoch für alle drei Spezies ähnliche relative Intensitäten auf (Tabelle 37).

Durch die in dieser Arbeit hinterlegten Referenzspektren für *K. psychrophila* DSM 26230 war es möglich, diese und auch weitere psychrophile Hefen, sowohl mittels der regulären Extraktionsmethode, als auch durch die verkürzte Proteinextraktion (YOTL) auf Speziesebene zu identifizieren. Eine massenspektrometrische Unterscheidung der *K. psychrophila*-Isolate aus frischen und aus verdorbenen Fleischpackungen war nicht möglich, jedoch konnten Unterschiede im Vergleich der relativen Intensitäten im Massenbereich zwischen 6150 – 6960 Da ausgemacht werden. Während die relative Intensität bei den Isolatzen aus frischem vakuumverpacktem Fleisch im Bereich von 6751 Da etwa 5 % betrug, erreichte sie bei den Isolatzen aus den verdorbenen Fleischproben bis zu 20 %. Die stärkste Abweichung war bei 6960 Da zu beobachten, da die relative Intensität bei den Isolatzen aus frischem Fleisch mit 30 % weit unter der relativen Intensität der Isolate aus verdorbenen Fleischproben von bis zu 70 % lag.

Tabelle 37: Zusammenfassung der Massenunterschiede zwischen *K. lodderae* CBS 2757 und *K. psychrophila* DSM 26230 und der Gemeinsamkeiten zu *Mrakia* spp.

<i>K. lodderae</i> CBS		<i>K. psychrophila</i>		<i>M. frigida</i> DSM		<i>M. gelida</i> DSM	
Masse	Intensität	Masse	Intensität	Masse	Intensität	Masse	Intensität
3297	16,6	3094	12,3	3095	5,1	3095	58,4
3338	5,6	3277	15,3	3277	25,0	3287	17,9
3447	18,0	-	-	3951	19,9	3950	13,1
5451	5,3	-	-	3443	4,1	3443	36,6
5483	5,2	3482	33,4	4931	30,5	4931	63,0
6014	27,6	5520	26,4	-	-	-	-
6150	100,0	6555	17,8	-	-	-	-
6596	18,4	6752	10,9	-	-	-	-
6896	37,0	-	-	-	-	-	-

CBS: Centraalbureau voor Schimmelcultures; DSM: Deutsche Stammsammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen; *K.*: *Kazachstania*; *M.*: *Mrakia*; Da: Dalton; -: keine Übereinstimmung

5 DISKUSSION

5.1 Vorkommen psychrophiler Hefen in vakuumverpacktem Fleisch

Im Zuge der Globalisierung und des daraus resultierenden internationalen Fleischhandels hat sich die Vakuumverpackung als Verpackungsart für frisch geschlachtete Fleischteilstücke seit den 1970er Jahren immer weiter durchgesetzt (Paniora, 2014). Einen besonderen Vorteil der Vakuumverpackung gegenüber dem traditionellen Abhängen, stellt die bis zu doppelt so lange Haltbarkeit des vakuumverpackten im Gegensatz zum trockengereiften Fleisch dar, die bei Lagerungstemperaturen um +0 °C etwa 3-12 Wochen betragen kann (Gill und Newton, 1978; Egan, 1983).

Neben psychrotoleranten Bakterien können Hefen regelmäßig aus frischem, vakuumverpacktem Fleisch isoliert werden (Dalton *et al.*, 1984; Deák, 2008; Kabisch *et al.*, 2010; Erl-Höning, 2014; Paniora, 2014). Psychrotolerante Genera wie *D. hansenii*, *C. zeylanoides*, *Yarrowia lipolytica* und *Rhodotorula* spp. gehören dabei zu den am häufigsten vorkommenden Hefen auf Fleisch (Asefa *et al.*, 2009; Kurtzman *et al.*, 2011; Ozturk und Sagdic, 2014). Sie sind Umweltkeime und werden oft aus der Umgebung in Kühlräumen, von Arbeitsgeräten in Schlachthäusern und aus der Luft isoliert (Dalton *et al.*, 1984; Gomaa *et al.*, 2003).

Über das Vorkommen psychrophiler Hefen in Lebensmitteln wurde bisher wenig berichtet. Die psychrophile Hefe *M. frigida* wurde bislang zwei Mal aus Fleisch isoliert (Kabisch *et al.*, 2010; Kabisch *et al.*, 2016), außerdem aus Joghurt (Moreira *et al.*, 2001) sowie aus Fruchtsaft (Schneider *et al.*, 2006). Über die Existenz von *K. psychrophila* in Rindfleisch wurde erstmals im Jahr 2013 berichtet (Kabisch *et al.*, 2013). Sie gilt bisher als einzige psychrophile Hefe des Genus *Kazachstania* (Kabisch *et al.*, 2013).

Die Genera *Mrakia* und *Kazachstania* repräsentieren ebenfalls Umgebungskeime, was den vektoriellen Eintrag in die Lebensmittel bezüglich der Ätiologie erhärtet. Zur Ätiologie dieser Spezies liegen aktuell noch keine gesicherten Informationen vor. Aufgrund der psychrophilen Eigenschaft kann nur vermutet werden, dass die Eintragung von *K. psychrophila* in den Schlachtprozess von einem kalten Ursprungshabitat durch Vektoren, wie Luft oder Wasser, stattfand.

In der neueren Literatur häufen sich Berichte über die Isolierung psychrophiler Hefen aus frischem, vakuumverpacktem Fleisch (Kabisch *et al.*, 2010; Kabisch *et al.*, 2013; Erl-Höning, 2014; Paniora, 2014). Die routinemäßige Inkubationstemperatur für Hefen beträgt +25 °C (Kurtzman *et al.*, 2011). Da ein Wachstum von psychrophilen Hefen nur bis maximal +20 °C zu erwarten ist, wurde vermutlich die Kontamination von Lebensmitteln mit diesen Hefen aufgrund der höheren Inkubationstemperatur bei Routineuntersuchungen bislang nicht erfasst.

Die Neubeschreibung von *K. psychrophila* im Jahr 2013 durch Kabisch *et al.* (2013) erfolgte nach ihrer Isolierung aus vakuumverpacktem Rindfleisch aus Deutschland. Auch die in dieser Arbeit untersuchten psychrophilen Hefen stammten überwiegend aus vakuumverpacktem Rindfleisch, ein Isolat aus Lammfleisch. Dabei hatte das Fleisch seinen Ursprung nicht nur in Deutschland, sondern stammte auch aus Argentinien und Australien (Paniora, 2014). Durch die Analyse der Gensequenz der D1/D2 Domäne konnten alle Isolate zu 99 % als *K. psychrophila* identifiziert werden.

Die Kontamination von Fleischproben aus dem internationalen Handel mit *K. psychrophila* (Paniora, 2014) zeigt, dass es sich bei der Kontamination nicht um eine regional beschränkte Problematik handelt. In der Vergangenheit wurden vor allem Rindfleischproben auf das Vorkommen psychrophiler Hefen untersucht (Paniora, 2014; Kabisch *et al.*, 2016). Weiterhin wurde unter Laborbedingungen ein von *K. psychrophila* ausgehendes Verderbspotential nachgewiesen (Kabisch *et al.*, 2016). Darüberhinaus wurde *K. psychrophila* inzwischen aus verdorbenem Fleisch isoliert (Bonke *et al.*, 2016b).

Inwieweit psychrophile Hefen, wie *K. psychrophila*, beim Verderb von vakuumverpacktem Fleisch eine Rolle spielen, sollte daher überprüft werden. Auch die Untersuchung von Fleisch anderer Tierarten auf das Vorhandensein psychrophiler Hefen wäre diesbezüglich wünschenswert.

5.2 Identifizierung von Hefen in Fleisch

Die Identifizierung von Hefen aus Lebensmitteln auf Speziesebene gestaltet sich durch umfangreiche morphologische, biochemische und molekularbiologische Untersuchungen als sehr zeit- und kostenintensiv (Senses-Ergul *et al.*, 2006; Spencer *et al.*, 2011; Chanprasartsuk *et al.*, 2013). Kommerziell erhältliche, biochemische Testsysteme sind vor allem auf die Diagnostik humanmedizinisch relevanter mesophiler Hefespezies ausgelegt und erlauben bezüglich lebensmittelassoziierter Hefen meist keine genaue Zuordnung (Spencer *et al.*, 2011).

Durch die morphologische Charakterisierung ergeben sich zwar oft Unterschiede bezüglich des Erscheinungsbildes der Genera, eine spezifische Zuordnung ist jedoch nur durch die Kombination der Informationen aus morphologischem Erscheinungsbild, Lichtmikroskopie und biochemischen Eigenschaften möglich.

Dies konnte beispielsweise durch den Vergleich der untersuchten *Kazachstania*-Spezies belegt werden, bei dem keine plattenmorphologische Unterscheidung zwischen *K. psychrophila* DSM 26230, *K. lodderae* CBS 2757, *K. servazzii* CBS 4311 und *K. unispora* CBS 398 möglich war.

Auch bei der Untersuchung der Wildstämme auf den verschiedenen Nährmedien fielen geringgradige morphologische Unterschiede auf. Diese äußerten sich beispielsweise in einer matt-glänzenden Oberfläche von Isolat 4 auf auf GYP-Agar im Gegensatz zu den anderen Isolaten mit perlmutartig glänzender Oberfläche. Auf SAB-Agar bildeten alle untersuchten Hefe-Isolate spiegeleiähnliche Einzelkolonien mit beigefarbender Verdunkelung im Zentrum der Kolonie. Bis auf zwei Isolate (Isolate 4 und 17) waren die Kolonieränder als glatt zu beurteilen, wohingegen die beiden genannten Isolate eine Lappung der Einzelkolonien aufwiesen. Dabei entstammte Isolat 4 aus einer verdorbenen Rindfleischprobe, Isolat 17 dagegen aus einer Fleischprobe ohne Verderbsanzeichen.

In der lichtmikroskopischen Untersuchung konnten Unterschiede in der Zellform und der Ascosporation zwischen den Isolaten ausgemacht werden, wobei sich das Erscheinungsbild der Hefezellen innerhalb eines Isolates abhängig vom verwendeten Medium ändern konnte.

Eine Ascosporation mit zwei oder mehr Ascosporen, wie sie Kabisch *et al.* (2013) für *K. psychrophila* in der Literatur beschreibt, konnte nur selten beobachtet werden und veränderte sich bereits innerhalb eines Isolates. Beispielsweise konnte für Isolat 6 nach

aerober Inkubation über 7 Tage bei +10 °C auf Columbia-Schafblutagar die Bildung von bis zu vier Ascosporen innerhalb eines Ascus beobachtet werden. Dies war jedoch auf den anderen Nährmedien zum selben Untersuchungszeitpunkt nicht der Fall, da hier hauptsächlich anamorphe Stadien, die eine Vermehrung durch unipolare Knospung zeigten, zu dokumentieren waren. Die Fähigkeit zur Ascosporulation kann unter Laborbedingungen verloren gehen und auch das Erscheinungsbild der Sporen ist variabel, was eine Identifikation insbesondere ascomycetaler Hefen anhand der Ascosporulation erschwert (Kurtzman *et al.*, 2011). Die Ascosporulation auf Blutagar ist vermutlich auf die verminderte Nährstoffversorgung der Hefezellen durch das Medium zurückzuführen, weswegen die Hefe in ihrer Fortpflanzung durch ungeschlechtliche Teilung gehemmt wird. In der Mehrheit der Isolate war eine Ascosporulation vorzugsweise auf MEA⁺ zu erkennen, was auch Kabisch *et al.* (2013) für *K. psychrophila* DSM 26230 bereits beobachten konnten. Für ascomycetale Hefen ist bekannt, dass manche Genera am Besten auf einem spezifischen Medium sporulieren (Kurtzman *et al.*, 2011). Wie die Ascosporulation, konnte auch die Bildung von Pseudohyphen hauptsächlich von MEA⁺ beobachtet werden. Dies lässt eine mangelhafte Nährstoffsituation von *K. psychrophila* auf MEA⁺ vermuten.

Insgesamt zeigten die Untersuchungen, dass ein Zusammentrag der Informationen aus physiologischem Verhalten und dem morphologischen, sowie lichtmikroskopischen Erscheinungsbild für eine Genuszuordnung unabdingbar ist. Teilweise kommt es innerhalb einer Spezies nicht nur zu morphologischen, sondern auch biochemischen Abweichungen, wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte.

Entgegen der Literaturangabe, in der *K. psychrophila* eine schwache und langsame Fermentation von Maltose zeigen soll (Kabisch *et al.*, 2013), konnte dies in vorliegender Arbeit nicht gezeigt werden (vgl. Kapitel 4.2.2). Weiterhin konnten zwischen den Wildstämmen biochemische Unterschiede nachgewiesen werden, was sich beispielsweise darin äußerte, dass nur ein Isolat (Isolat 5) einen positiven Farbumschlag beim D-Xylose-Test besaß (vgl. Kapitel 4.2.2).

Die deutlichen Unterschiede im biochemischen Verhalten lassen die Existenz verschiedener Subtypen der Spezies *K. psychrophila* vermuten, wobei diesbezüglich keine herkunftsbezogene Korrelation festgestellt werden konnte.

Mit der molekularbiologischen Sequenzanalyse der D1/D2 Domäne und dem Vergleich der einzelnen Isolatsequenzen konnten in dieser Studie keine Unterschiede in der Basenabfolge

ausfindig gemacht werden. Mit der Amplifikation des 26S rDNA Genabschnitts der großen Untereinheit ist demzufolge zwar eine eindeutige Identifizierung ascomycetaler Hefen auf Speziesebene möglich, jedoch keine Bestimmung von Subtypen. Daher wäre in einer weitergehenden Studie eine gesamtgenomische Analyse der einzelnen Isolate und der Vergleich der jeweiligen Genome miteinander wünschenswert, was mehr Aufschluss über die Eigenschaften der Subtypen geben könnte.

Im Zuge der Gesamtgenomanalyse von *K. psychrophila* wäre zusätzlich ein Vergleich mit *K. lodderae* sinnvoll. Die genetisch eng verwandte Hefe *K. lodderae* stellt einen Umweltkeim dar, der aus Bodenproben isoliert werden konnte (Kurtzman *et al.*, 2011). Durch die hohe genetische Übereinstimmung der beiden *Kazachstania*-Spezies von 97 % (Kabisch *et al.*, 2013) erscheint es möglich, dass *K. psychrophila* eine speziell an kalte Lebensräume adaptierte Mutation von *K. lodderae* darstellen könnte.

5.3 Massenspektrometrische Charakterisierung

Die untersuchten Isolate konnten durch die Analyse der 26S rDNA Gensequenz ausnahmslos der Spezies *K. psychrophila* zugeordnet werden. Dies belegt, dass das Verfahren der Sequenzanalyse der D1/D2 Domäne eine sichere Methode der Identifizierung darstellt, die jedoch mit hohen Materialkosten und größerem Zeitaufwand verbunden ist, insbesondere wenn eine Vielzahl an unterschiedlichen Hefe-Isolaten aus einer Fleischprobe zu bestimmen sind.

Durch die MALDI-TOF-MS kann diese Identifikation ebenso sicher, doch mit weniger Zeit- und Kostenaufwand geschehen (Pinto *et al.*, 2011; Bader, 2013). Jedoch wirkt sich der derzeit nur in geringem Maße vorhandene Datensatz für verderbsassoziierte Hefen aus Lebensmitteln in der Software des Geräteherstellers (Biodyper 3.1.66 OC™, Bruker Daltoniks) limitierend auf eine erfolgreiche Identifikation aus (Pavlovic *et al.*, 2014).

Ein Problem stellt die teilweise schlechte Reproduzierbarkeit einzelner Messungen von Hefen dar, was sich nachteilig auf deren erfolgreiche Identifizierung auswirken kann. Dabei scheinen charakteristische Peaks nicht betroffen zu sein (Usbeck *et al.*, 2013). Unter anderem wird diesbezüglich der Einfluss des Generationsstadiums, der Temperatur und des Substrates auf die Zellwandzusammensetzung im Hinblick auf die Reproduzierbarkeit diskutiert (Aguilar-Uscanga und François, 2003; Usbeck *et al.*, 2013).

Aguilar-Uscanga und François (2003) beschrieben eine Zunahme der Zellwandstabilität in Anwesenheit von Maltose und Galactose während der Kultivierung, wohingegen Glucose, Mannose und Sucrose keinen Einfluss auf die Zellwandzusammensetzung ausübten. Daher wurden im Vorversuch zur vorliegenden Arbeit der Einfluss unterschiedlicher Nährmedien auf die Reproduzierbarkeit der Massenspektren getestet. Für die mesophile Hefe *C. albicans* ATCC 10231 konnten nach Kultivierung und anschließender Messung von den Nährmedien MEA⁺, GYP-Agar, YGC-Agar, SAB-Agar keine massenspektromtrischen Unterschiede ausgemacht werden. Dies könnte darin begründet liegen, dass die meisten Hefeselektivnährböden Glucose als Hauptkohlenhydratanteil enthalten, welche keinen Einfluss auf die Zellwandzusammensetzung zu haben scheint (Aguilar-Uscanga und François, 2003). In den Messungen, bei denen *C. albicans* ATCC 10231 auf CBA kultiviert wurde, waren verglichen mit den Messungen von den hefespezifischen Nährmedien im Mittel mehr Massen (n=79) feststellbar. Dies hatte jedoch keinen negativen Einfluss auf den Score Value (2,230).

Auch die Arbeitsgruppe um Usbeck *et al.* (2013) kam bei der Untersuchung des Einflusses des Substrates auf die massenspektrometrische Messbarkeit der verderbsassoziierten Hefen *S. cerevisiae*, *D. hansenii* und *Wickerhamomyces anomalus* zu dem Ergebnis, dass die Messbarkeit in keinem Fall vom zur Verfügung gestandenen Substrat beeinflusst war.

Bei der Untersuchung des Substrateinflusses auf die psychrophile Hefe *K. psychrophila* DSM 26230 waren ebenso geringgradige massenspektrometrische Unterschiede feststellbar. Im Vergleich der Massenspektren bei Anzucht der Hefe auf Blutagar kam es zur Darstellung einer Masse im niedrigeren Massenbereich (2.174 Da) mit einer mittleren Intensität von 735 bei 70,4 % der Spektren, die bei keinem der anderen verwendeten Nährböden nachweisbar war. Zusätzlich kam es von diesem Nährboden im Massenbereich von 3.340 Da zu einer Erhöhung der mittleren Intensität auf 3190 (RSD 66,4 %) im Vergleich zu den Peaks gemessen von den anderen Nährmedien, bei denen die maximale mittlere Intensität 1159 (RSD 43,9 %) betrug. Eine Erhöhung der mittleren Massenzahl von der Messung auf CBA, wie bei *C. albicans* ATCC 10231, konnte nicht nachgewiesen werden.

Während der Kultivierungsphase war im Vergleich zu den anderen Nährmedien eine verlangsamte Generationszeit von *K. psychrophila* auf Blutagar zu verzeichnen, was vermutlich auf die Zusammensetzung von Schafblutagar mit einem Mangel an ausreichend vorhandenen Kohlenhydraten zurückzuführen ist. Denkbar wäre daher, dass die Ursache in der leichten Massendivergenz auf einen Substratmangel während der Kultivierung zurückzuführen ist und dadurch eine instabilere Zellwand induziert wurde, als dies auf hefespezifischen Nährmedien der Fall war. Diese Massendivergenz kann zu einer nachteiligen Beeinflussung des Identifikationsergebnisses führen, da Massen, die nicht im Referenzspektrum enthalten sind, die Höhe des Übereinstimmungswertes (Score Value) negativieren können. Dies konnte jedoch in den eigenen Untersuchungen nicht belegt werden, da es zu keiner wesentlichen Beeinträchtigung des mittleren Score Values (2,338) kam und daher eine sichere Identifikation auf Speziesebene möglich war.

Zusammenfassend kann daher gesagt werden, dass das Kernbild der spezifischen Massen von *K. psychrophila* unbeeinflusst vom Substrat bleibt, wodurch eine verlässliche Identifikation unabhängig vom verwendeten Nährmedien erfolgen kann.

Nicht nur wegen der breiteren Konstanz der Spektren, sondern auch wegen der höheren Wachstumsrate während der Kultivierungsphase wurde für die weiteren

massenspektrometrischen Untersuchungen Sabouraud-Agar verwendet. Weiterhin wurden die selbst erstellten Referenzspektren auf Basis der Proteinextraktion mit Ethanol (100 %) und Ameisensäure (70 %) als Präparationsmethode erstellt. Denn beim Direkttransfer wird die Lyse der Zellwand hauptsächlich durch die in der Matrix enthaltenen Agenzien induziert, was für Bakterienzellwände ausreichend erscheint. Aufgrund der erhöhten Stabilität von Hefezellwänden wird bei diesen jedoch keine ausreichende Lyse bewirkt, sodass durch das bloße Austragen auf eine Targetplatte und die Übersichtung mit Matrix keine validen Messungen erzeugt werden konnten. Deshalb fand diese Präparationsmethode in vorliegender Arbeit keine Anwendung.

Mit der verkürzten Form der Proteinextraktion (YOTL) können durch geringeren Aufwand der Präparation und damit einhergehender Zeitersparnis mehrere unterschiedliche Isolate einer Probe auf Speziesebene identifiziert werden, was einen besonderen Vorteil gegenüber der standardmäßigen Proteinextraktionsmethode mit Ethanol und Ameisensäure darstellt. Dabei können die Fingerprints auf Basis der YOTL weniger spezifische Massen enthalten, als dies mit der Extraktionsmethode der Fall ist. Charakteristische Massen von hoher Intensität sind jedoch immer vertreten. Massen niedrigerer Intensitäten werden teilweise aufgrund eines niedrigeren S/N-Verhältnisses überlagert. Diese Beobachtungen decken sich mit denen der Arbeitsgruppe um Bernhard *et al.* (2014), die diese Methode zum Zweck der schnelleren Identifikation von klinischen Hefe-Isolaten optimiert hatten.

In vorliegender Arbeit erfolgte ein Vergleich der Massenspektren von Wildstämmen der Spezies *K. psychrophila*. Für den Abgleich der Massenspektren war es obligat, auch kleine Abweichungen der jeweiligen Massenspektren zu erkennen. Aus diesem Grund wurden alle Isolate mit der Proteinextraktionsmethode mit Ethanol (100 %) und Ameisensäure (70 %) präpariert, da durch die Aufreinigung hochwertigere Spektren erzielt werden können (Bader, 2013; Cassagne *et al.*, 2013). Auch für *K. unispora* CBS 398, *K. servazzii* CBS 4311, *K. lodderae* CBS 2757 wurden jeweils Referenzspektren erstellt, wobei im Laufe dieser Studie ein Softwareupdate (Biotyper 3.1.66 OC™) durch die Herstellerfirma Bruker Daltoniks erfolgte, welches seither das Referenzspektrum für *K. lodderae* CBS 2757 beinhaltet.

Bei der Erstellung des Summenspektrums für *K. lodderae* CBS 2757 konnten mit dem bisher verwendeten Extraktionsprotokoll keine Einzelspektren guter Qualität erzeugt werden. Während der Messung mit der MALDI-TOF-MS kam es zu zahlreichen Nullspektren oder zu Spektren mit wenigen aussagekräftigen Massen (im Mittel 7 Massen) bei unzureichendem

S/N-Verhältnis (<3). Mit dem standardmäßigen Proetienextraktionsprotokoll war keine ausreichende Lyse der Zellwand zu erreichen und damit eine Extraktion der ribosomalen Proteine nur bedingt möglich.

Da die Substratabhängigkeit als Grund für diese Divergenzen durch die Vorversuche weitgehend ausgeschlossen werden konnte, wurde für die weiteren Messungen von *K. lodderae* der Einfluss der Inkubationszeit, sowie der Inkubationstemperatur getestet (Aguilar-Uscanga und François, 2003; Qian *et al.*, 2008; Ruiz-Herrera und Ortiz-Castellanos, 2010; Usbeck *et al.*, 2013). Denn eine Variation in der Stärke der Zellwand wirkt sich einschränkend auf deren lytische Sensitivität aus (Aguilar-Uscanga und François, 2003), was wiederum die einzelnen Spektren in ihrer Qualität beeinträchtigen kann (Qian *et al.*, 2008; Usbeck *et al.*, 2013).

Durch die Modifikation der Anzuchtbedingungen in Anlehnung an die Publikation von Qian *et al.* (2008) konnte die beschriebene Problematik abgestellt werden.

Die erste Variation bestand in der Veränderung der Einwirkzeit für Ameisensäure, um eine bessere Lyse der Zellwand zu erreichen (Bader, 2015). Bei einer Einwirkzeit über 10 Minuten konnte eine Erhöhung der mittleren Peakzahl auf 17,1 mit einem S/N-Verhältnis >3 erreicht werden. Nach 12 und 15 Minuten wurde jedoch wieder eine Negativtendenz der Peaks beobachtet, weiterhin kam es zu zahlreichen Flatlines (Nulllinien).

Im zweiten Schritt wurde die Inkubationszeit für *K. lodderae* verkürzt, da Usbeck *et al.* (2013) einen massenspektrometrisch messbaren Unterschied bezogen auf die Wachstumsphase von Hefen beschrieben. Tatsächlich führte die Verkürzung der Inkubationszeit auf 18 Stunden zu einer wesentlich besseren Extraktion der ribosomalen Proteine und damit zu Massenspektren von guter Qualität mit höherem S/N-Verhältnis und gleichmäßiger Intensität der spezifischen Peaks, was eine verlängerte Einwirkzeit von Ameisensäure (70 %) überflüssig machte.

In einem dritten Schritt wurde die Bebrütungstemperatur verändert, da sich der Verdacht der Zellwandvariation durch die verkürzte Inkubation erhärtet hatte.

In der Literatur ist die enzymgesteuerte Modifikation der Zellwand für Hefen beschrieben (Aguilar-Uscanga und François, 2003; Ruiz-Herrera und Ortiz-Castellanos, 2010), sowie die Abnahme der Enzymaktivität für mesophile Spezies bei kalten Temperaturen (Feller und Gerday, 2003; Struvay und Feller, 2012). Aguilar-Uscanga und François (2003) machten mit der Untersuchung des Temperatureinflusses auf die Zellwandzusammensetzung von

S. cerevisiae ähnliche Beobachtungen. Mit steigender Temperatur im Bereich zwischen +22 – +37 °C, welcher für *S. cerevisiae* als optimaler Temperaturbereich gilt, konnte ein steigender Chitingehalt in der Zellwand beobachtet werden, während sich der Gehalt von β -Glucan und Mannan unverändert verhielt. Mit dem erhöhten Chitingehalt war gleichzeitig eine Abnahme der Sensitivität auf das lytische Enzym Zymolase zu verzeichnen (Aguilar-Uscanga und François, 2003). Es ist zu vermuten, dass auch *K. lodderae* unter den für sie optimalen Inkubationsbedingungen eine äußerst stabile Zellwand entwickelt.

Da es sich bei *K. lodderae* um eine mesophile Spezies handelt, ist davon auszugehen, dass die enzymatische Aktivität innerhalb der Hefezelle bei kalten Temperaturen abnimmt, was eine Herabsetzung oder Verlangsamung der gesamten Stoffwechselprozesse innerhalb der Hefezelle zur Folge hat. Dadurch könnte der enzymgesteuerte Einbau von Chitin in die Zellwand und damit die Ausbildung einer verstärkten Zellwandstabilität verlangsamt sein, sodass nach 48 Stunden noch keine ausreichende Stabilität erreicht werden konnte, was die Aufschließung durch Ameisensäure erleichtern würde. Um dies letztendlich bestätigen zu können, müsste in weitergehenden Untersuchungen eine genaue Analyse der Zellwand von *K. lodderae* CBS 2757 in Abhängigkeit der genannten Inkubationsbedingungen erfolgen.

Die für *K. lodderae* beschriebene Problematik konnte bei der Extraktion von *K. psychrophila* DSM 26230 nicht im genannten Ausmaß beobachtet werden, obgleich eine geringgradige Diversität der einzelnen Summenspektren im Vergleich der Isolate zueinander zu beobachten war. Die Unterschiede äußern sich vor allem in der Intensität der Massen und in einer teilweise höheren S/N Ratio bei gleichen Inkubations- und Extraktionsbedingungen. Möglicherweise korreliert die teilweise unterschiedliche Enzymausstattung der einzelnen Isolate mit der Extraktionsfähigkeit für die Massenspektrometrie. Eine validierte statistische Berechnung (ClinProTools 3.0™, Bruker Daltoniks) hierzu konnte in dieser Arbeit nicht erfolgen, da pro biochemische Gruppe (A-G) zu wenige Isolate zur Verfügung standen. Jedoch wurde durch die Darstellung der Summenspektren im MSP-Dendrogramm (Biotyper 3.1.66 OC™, Bruker Daltoniks) deutlich, dass sich einige Isolate (Isolate 5, 6, 9, 11, 12, 13), die verdorbenen Fleischproben entstammen, durch Clusterbildung von der Mehrheit absetzen. Diese Isolate konnten auch gesonderten biochemischen Gruppen zugeordnet werden (B, C, D, E), was die Möglichkeit des Vorhandenseins von Subtypen unterstreicht. Es wäre daher wünschenswert, noch mehr *K. psychrophila*-Isolate, die die gleichen biochemischen Eigenschaften einer Gruppe mitbringen, zu sammeln, um einen statistischen Vergleich der Spektren berechnen zu können.

In der visuellen Gegenüberstellung der Massenspektren der Hefe-Isolate aus den frischen Fleischproben und aus den verdorbenen Proben konnten geringgradige Unterschiede der relativen Intensitäten im Massenbereich zwischen 6150 Da und 6960 Da dargestellt werden. Die Isolate aus frischen Fleischproben wiesen hier geringere relative Intensitäten auf. Möglicherweise stehen diese Proteine in einem Zusammenhang mit einem erhöhten Verderbspotential, was jedoch an dieser Stelle nur vermutet werden kann. Diesbezüglich wäre in einer weiterführenden Arbeit eine genauere Subtypisierung von Hefespezies durch proteomanalytische Methoden oder ein Aufschluss besagter Proteine mittels Proteinfragmentierung denkbar. Da sich das Molekulargewicht enzymatischer Proteine im Massenbereich von ca. 60 kDa befindet und Transkriptionsfaktoren erst in einem messbaren Bereich zwischen 110-125 kDa auffindig gemacht werden können, liegen diese außerhalb des messbaren Bereichs der MALDI-TOF-MS. Möglicherweise wird dies jedoch durch eine Optimierung der Ionisation durch die Matrizen oder der Extraktionsmethoden künftig möglich sein (Bader, 2013).

Weiterhin wurden durch die durchgeführten Untersuchungen und den Vergleich der Massen der psychophilen Hefen *K. psychrophila* DSM 26230, *M. frigida* DSM 4643 und *M. gelida* DSM 70882 ähnliche Massen mit jedoch teilweise abweichenden Intensitäten identifiziert. Die Klärung der Funktion dieser Proteine und ob sie eventuell in Zusammenhang mit der psychophilen Eigenschaft der jeweiligen Hefen in Zusammenhang stehen, konnte in dieser Arbeit aus oben genannten Gründen nicht vollständig geklärt werden. Hierzu wäre die massenspektrometrische Untersuchung weiterer psychrophiler Hefespezies wünschenswert, wodurch geklärt werden könnte, ob auch Spezies wie beispielsweise *Rhodotorula psychrophila* eine Masse im Bereich von 3277 Da mit ähnlicher Intensität aufweisen.

Mit dieser Arbeit wurden die vorhandenen massenspektrometrischen Daten in der Herstellerdatenbank (Biotyper 3.1.66 OC™, Bruker Daltoniks) unter anderem um die psychophilen Hefespezies *K. psychrophila*, *M. frigida* DSM 4634 und *M. gelida* DSM 70882 erweitert, wodurch deren sichere und effiziente Identifikation durch die MALDI-TOF-MS auf Speziesebene möglich ist. Ein wesentlicher Vorteil besteht im Wegfallen langwieriger morphologischer und biochemischer Untersuchungsverfahren. Insbesondere kommerziell erhältliche, biochemische Testkits dürften in den meisten Fällen bezogen auf die Identifikation psychrophiler Hefen ohnehin erfolglos bleiben, da der Schwerpunkt der meisten kommerziellen Testsysteme (z.B. API 20 AUX®) in der Differenzierung klinisch relevanter

Erreger liegt. Auch durch die kostenintensive molekularbiologische Sequenzanalyse ist mit einer Dauer von bis zu einer Woche bis zum Erhalt des Ergebnisses zu rechnen, wenn man davon ausgeht, dass nach einer Inkubationszeit von 72 Stunden bereits genügend Koloniematerial gewachsen ist, um eine DNA-Extraktion durchführen zu können.

Vorrausgesetzt, dass die Hinterlegung von Referenzdaten bereits erfolgt ist, kann eine Identifikation verschiedener, psychrophiler Hefe-Spezies mittels der MALDI-TOF-MS bereits innerhalb weniger Minuten erfolgen. Limitierend auf den Zeitfaktor wirkt sich jedoch die vorherige Kultivierung der Isolate aus, die bei der Untersuchung einer Lebensmittelprobe erfolgen muss. Bei psychrophilen Hefen kann diese einen Zeitraum zwischen 48 Stunden bis zu mehreren Tagen betragen. Auch das weitgehende Fehlen von Referenzdaten wirkt sich limitierend auf eine erfolgreiche Identifikation von aus Lebensmitteln isolierten Hefen aus, was jedoch durch den weiteren Ausbau hinterlegter Referenzdaten abgestellt werden kann. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass eine Identifikation von lebensmittelassoziierten psychrophilen Hefen sowohl mit der Extraktionsmethode, als auch mit der Yeast On Target Lysis erfolgreich identifiziert werden können, obgleich mit der YOTL nicht immer auf Anhieb eine Identifikation auf Speziesebene erfolgt.

5.4 Verderbspotential psychrophiler Hefen

Unter Laborbedingungen wurde bereits ein von *K. psychrophila* DSM 26230 ausgehendes Verderbspotential beschrieben (Kabisch *et al.*, 2016). Dieses äußerte sich in der Entstehung eines „muffigen Geruchs“, sowie Verfärbungen und der Bildung von Gasbläschen nach einem Zeitraum von 15 Tagen. Weiterhin wurde für *K. psychrophila* ein Wachstum bei niedrigen Sauerstoffkonzentrationen und eine acidotische pH-Wert-Toleranz beschrieben, sowie die Möglichkeit sich unter genannten Bedingungen rasch zu vermehren (von weniger 10^2 KBE auf über 10^6 KBE innerhalb von 2 Wochen) (Kabisch *et al.*, 2016). Nach 82 Tagen wurden die untersuchten Rindfleischproben als vollständig verdorben eingestuft, wobei eine aufgeblähte Umverpackung bei keinen der Proben des Challengeversuchs beschrieben wurde.

Von den in vorliegender Studie als *K. psychrophila* identifizierten Isolat (n=20) konnten insgesamt 13 aus vakuumierten Rindfleischproben mit deutlichen Verderbsanzeichen und aufgeblähter Umverpackung isoliert werden (Bonke *et al.*, 2016b). Das Mindesthaltbarkeitsdatum dieser Fleischproben war zu diesem Zeitpunkt noch nicht erreicht, was auf einen sehr raschen Verderb der Proben schließen lässt und im Hinblick auf die Ergebnisse von Kabisch 2015 eher untypisch für *K. psychrophila* zu sein scheint. Sieben der insgesamt 20 untersuchten *K. psychrophila*-Isolate stammen aus vakuumverpackten Rind- bzw. Lammfleischproben, welche zum Zeitpunkt der Untersuchung keinen Hinweis auf ein Verderbsgeschehen lieferten, obwohl das Mindesthaltbarkeitsdatum bereits erreicht war.

Dies wirft die Frage zum Verderbspotential von *K. psychrophila* unter realen Bedingungen auf. Vermutlich ist von dieser *Kazachstania*-Spezies ein eher geringes Verderbspotential auszugehen, da sieben Isolate aus unverdorbenem Fleisch isoliert wurden, das das Mindesthaltbarkeitsdatum bereits erreicht hatte (Paniora 2014). Während der rasche Verderb der übrigen 13 Fleischproben mit *Kazachstania*-Isolaten eher durch andere Mikroorganismen bedingt war (Bonke *et al.*, 2016b). Tatsächlich konnten in den verdorbenen Proben neben *K. psychrophila* psychrophile *Clostridium* spp. nachgewiesen werden, worauf der rasche Verderb der Fleischproben nachweislich zurückzuführen war (Bonke *et al.*, 2016b). Denkbar wäre auch ein synergistisches Verderbsgeschehen zwischen *K. psychrophila* und psychrophilen *Clostridia* spp. in vakuumverpacktem Fleisch, da in den sieben unverdorbenen Fleischproben lediglich *Kazachstania*, aber keine Clostridien nachweisbar waren (Bonke *et al.*, 2016a).

Eine Unterscheidung der Isolate aus verdorbenen und aus frischen vakuumverpackten Fleischproben konnte weder mittels konventioneller Methoden, noch mittels MALDI-TOF-MS vorgenommen werden. Um das tatsächliche Verderbspotential von psychrophilen Hefespezies in Fleisch unter dem Einfluss der Begleitmikrobiota einschätzen zu können, sind weitere Untersuchungen erforderlich.

Durch eine Umgestaltung der mikrobiellen Population in Vakuumverpackungen besteht die Möglichkeit, dass sich psychrophile Hefen, aufgrund fehlender Konkurrenzmikrobiota und guter Adaption, künftig zur vorherrschenden Population etablieren und so die wirtschaftliche Problematik des vorzeitigen Fleischverderbs weiter verstärken könnten.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Psychrophile Hefen sind ubiquitär vorkommende Pilze, die sich an extreme Lebensbedingungen angepasst haben. Inzwischen konnten sie auch aus unterschiedlichen Lebensmitteln isoliert werden. Hinsichtlich ihrer Eigenschaften und ihrer Bedeutung als Verderbserreger existieren nur wenige Kenntnisse.

In vorliegender Arbeit wurden insgesamt 20 psychrophile Hefe-Isolate mykologisch untersucht. Alle Isolate haben ihren Ursprung in vakuumverpackten Fleischproben, bei denen es sich teilweise um verdorbene Rindfleischproben aus Deutschland (n=3), sowie um vakuumverpacktes Frischfleisch aus Australien (n=3), Argentinien (n=2) und Deutschland (n=2) handelte. Von den 20 psychrophilen Isolaten stammten 7 Isolate aus den frischen vakuumverpackten Fleischproben und 13 Isolate aus verdorbenem vakuumverpacktem Fleisch. Die Isolate wurden phänotypisch, biochemisch, genotypisch und massenspektrometrisch untersucht. Die Genotypisierung erlaubte eine Zuordnung aller untersuchten Hefe-Isolate zu *Kazachstania (K.) psychrophila*. Bei der morphologischen Beurteilung ergab sich eine Lappung der Kolonieränder auf Sabouraud-Agar für zwei Isolate (Isolate 4 und 17), was auf das Vorhandensein von Subspezies für *K. psychrophila* schließen lassen könnte. Die biochemische Untersuchung bestätigte diesen Eindruck, da die Hefe-Isolate in insgesamt 7 Gruppen (A-G) unterteilt werden konnten. Eine Korrelation der Gruppeneinteilung mit den morphologischen Unterschieden und der Herkunft der Isolate konnte jedoch nicht beobachtet werden.

Ein Schwerpunkt dieser Arbeit war es, unter Berücksichtigung des Einflusses der Anzuchtbedingungen, massenspektrometrische Referenzdaten auf Basis der MALDI-TOF-MS für die psychrophilen Hefen *K. psychrophila*, *M. frigida* und *M. gelida*, sowie für die mesophilen Spezies *K. lodderae*, *K. servazzii* und *K. unispora* zu erstellen. Dabei wurde für *K. psychrophila* ein Einfluss der Kultivierung auf Columbia-Schafblutagar auf das massenspektrometrische Erscheinungsbild nachgewiesen, was sich jedoch nicht negativ auf die Identifizierbarkeit auswirkte. Neben der eindeutigen Identifizierung aller 20 Isolate als *K. psychrophila* mittels MALDI-TOF-MS wurde zusätzlich eine verkürzte Extraktionsmethode (YOTL) mit Erfolg getestet. Neben der Sequenzanalyse erwies sich damit die MALDI-TOF-MS als eine verlässliche Alternative zur Identifikation psychrophiler Hefen aus Lebensmitteln.

7 SUMMARY

Due to their ability to grow at low temperatures and their low requirement for essential nutrition, psychrophilic yeasts have successfully colonized permanent cold environments. In the past they were also found in different types of food, particularly in chilled vacuum-packed beef. There is little information about how they enter food and their true capability to cause spoilage in food.

Therefore, 20 psychrophilic yeast isolates from fresh (n=7) and spoiled (n=3) vacuum-packed meat samples had been examined mycologically. The meat samples had their origin in Germany (n=5), Australia (n=3) and Argentina (n=2). The spoiled meat samples (n=3) originated from Germany.

By sequencing the 26S rDNA gene of the large subunit, all strains (n=20) were identified as *K. psychrophila*, whereby morphological and biochemical divergences had been observed. An example for morphological divergences is the forming of irregularly formed margins on Sabouraud's agar by two of the isolates (isolate 4 and 17). This highlights the possibility of the existence of subtypes belonging to the psychrophilic yeast *K. psychrophila*. This impression was confirmed by the division of the yeast isolates in 7 different biochemical groups (A-G). A correlation between isolates from fresh vacuum-packed meat and spoiled meat in view of the morphologic and biochemical divergences could not have been observed.

A main focus of this work was the reliable identification of psychrophilic food-borne yeasts by the MALDI-TOF technique, involving the influence of the culture conditions on yeast spectra. While in clinical laboratories the MALDI-TOF-MS has been successfully introduced for rapid species identification of human pathogenic microorganisms, there is no reliable and rapid way of identifying a large amount of food-borne yeasts. Therefore, sequencing the 26S rDNA gene of the large subunit is still the gold standard in identifying food-borne yeasts, which is both time-consuming and involves huge costs.

In present study could have been shown, that apart from genetical analysis the identification of psychrophilic yeasts by MALDI-TOF-MS affords a reliable alternative.

8 LITERATURVERZEICHNIS

Aguilar-Uscanga, B. und François, J.M. (2003). A study of the yeast cell wall composition and structure in response to growth conditions and mode of cultivation. *Lett Appl Microbiol* 37(3): 268-74.

Amiri-Eliasi, B. und Fenselau, C. (2001). Characterization of protein biomarkers desorbed by MALDI from whole fungal cells. *Anal Chem* 73(21): 5228-31.

Anonymous (2012). MALDI Biotyper 3.1 User Manual. Bruker Daltonics GmbH; Bremen.

Anonymous (2014). MALDI Biotyper Protocol Guide. Bruker Daltonics GmbH; Bremen.

Anonymous (2015). New release of the MALDI Biotyper reference library for microbial identification. <https://www.bruker.com/nc/news-records/single-view/article/new-release-of-the-maldi-biotyper-reference-library-for-microbial-identification.html>:
<https://www.bruker.com/nc/news-records/single-view/article/new-release-of-the-maldi-biotyper-reference-library-for-microbial-identification.html>. Bruker Daltonics, Bremen; Zugriffsdatum 15.02.16.

Asefa, D.T., Moretro, T., Gjerde, R.O., Langsrud, S., Kure, C.F., Sidhu, M.S., Nesbakken, T. und Skaar, I. (2009). Yeast diversity and dynamics in the production processes of Norwegian dry-cured meat products. *Int J Food Microbiol* 133(1-2): 135-40.

ATCC (2016). American Type Culture Collection. Teddington, United Kingdom; http://www.lgcstandards-atcc.org/Search_Results.aspx?dsNav=Ntk:PrimarySearch%7cCandida+albicans+ATCC+10231%7c3%7c,Ny:True,Ro:0,N:1000552&searchTerms=Candida+albicans+ATCC+10231&redir=1; Zugriffsdatum 13.01.16.

Bader, O., Weig, M., Taverne-Ghadwal, L., Lugert, R., Groß, U. und Kuhns, M. (2011). Improved clinical laboratory identification of human pathogenic yeasts by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin Microbiol Inf* 17(9): 1359-65.

Bader, O. (2013). MALDI-TOF-MS-based species identification and typing approaches in medical mycology. *Proteomics* 13(5): 788-99.

Bader, O. (2015). Persönliche Mitteilung, 09.09.2015.

Barnett, J.A., Payne, R.W. und Yarrow, D. (2000). *Yeasts characteristics and identification*(Ed.), Cambridge University Press, New York; 3. Auflage, 15-20.

Barrett, J. (2001). Thermal hysteresis proteins. *Int J Biochem Cell Biol* 33(2): 105-17.

- Bernhard, M., Weig, M., Zautner, A.E., Gross, U. und Bader, O. (2014). Yeast on-target lysis (YOTL), a procedure for making auxiliary mass spectrum data sets for clinical routine identification of yeasts. *J Clin Microbiol* 52(12): 4163-7.
- Bessède, E., Solecki, O., Sifre, E., Labadi, L. und Megraud, F. (2011). Identification of *Campylobacter* species and related organisms by matrix assisted laser desorption ionization-time of flight (MALDI-TOF) mass spectrometry. *Clin Microbiol Infect* 17(11): 1735-9.
- Bille, E., Dauphin, B., Leto, J., Bougnoux, M.E., Beretti, J.L., Lotz, A., Suarez, S., Meyer, J., Join-Lambert, O., Descamps, P., Grall, N., Mory, F., Dubreuil, L., Berche, P., Nassif, X. und Ferroni, A. (2012). MALDI-TOF MS Andromas strategy for the routine identification of bacteria, mycobacteria, yeasts, *Aspergillus* spp. and positive blood cultures. *Clin Microbiol Infect* 18(11): 1117-25.
- Bills, G.F. und Foster, M.S. (2004): Formulae for selected materials used to isolate and study fungi and fungal allies. In: M. S. Foster, G. F. Bills und G. M. Müller (Eds.). *Biodiversity of Fungi. Inventory and Monitoring Methods*. Elsevier, Amsterdam; Kapitel II, 595-618.
- Boerema, J.A., Broda, D.M. und Bell, R.G. (2003). Abattoir sources of psychrophilic clostridia causing blown pack spoilage of vacuum-packed chilled meats determined by culture-based and molecular detection procedures. *Lett Appl Microbiol* 36: 406-11.
- Bonke, R., Drees, N. und Gareis, M. (2016a). Detection of psychrophilic and psychrotolerant *Clostridium* spp. in chilled fresh vacuum-packed meat using different PCR methods. *FEMS Microbiol Lett* 363(1).
- Bonke, R., Dress, N. und Gareis, M. (2016b). Lecithinase positive psychrophilic *Clostridium* spp. in cases of blown pack spoilage of chilled vacuum-packed beef from German retail. *Int J Food Microbiol* submitted.
- Borch, E., Kant-Muermans, M.-L. und Blixt, Y. (1996). Bacterial spoilage of meat and cured meat products. *Int J Food Microbiol* 33(1): 103-20.
- Brizzio, S., Turchetti, B., de Garcia, V., Libkind, D., Buzzini, P. und van Broock, M. (2007). Extracellular enzymatic activities of basidiomycetous yeasts isolated from glacial and subglacial waters of northwest Patagonia (Argentina). *Can J Microbiol* 53(4): 519-25.
- Broda, D.M., DeLacy, K.M., Bell, R.G., Braggins, T.J. und Cook, R.L. (1996). Psychrotrophic *Clostridium* spp. associated with 'blown pack' spoilage of chilled vacuum-packed red meats and dog rolls in gas-impermeable plastic casings. *Int J Food Microbiol* 29(2-3): 335-52.
- Buzzini, P., Branda, E., Goretti, M. und Turchetti, B. (2012). Psychrophilic yeasts from worldwide glacial habitats: diversity, adaptation strategies and biotechnological potential. *FEMS Microbiol Ecol* 82(2): 217-41.
- Buzzini, P. und Margesin, R. (2014): Cold adapted yeasts: A lesson from the cold and a challenge for the XXI. century. In: P. Buzzini und R. Margesin (Eds.). *Cold-Adapted Yeasts:*

Biodiversity, Adaption Strategies and Biotechnical Significance. Springer Verlag, Heidelberg, New York, Dordrecht, London Kapitel 1, 4-15.

Campbell, I.B. und Claridge, G.G.C. (2004): Soil Properties and Relationships in Cryosols of the Region of the Transantarctic Mountains in Antarctica. In: J. Kimble (Eds.). Cryosols. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg; Kapitel 37, 713-26.

Caprioli, R.M., Farmer, T.B. und Gile, J. (1997). Molecular imaging of biological samples: localization of peptides and proteins using MALDI-TOF MS. Anal Chem 69(23): 4751-60

Cassagne, C., Ranque, S., Normand, A.C., Fourquet, P., Thiebault, S., Planard, C., Hendrickx, M. und Piarroux, R. (2011). Mould routine identification in the clinical laboratory by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. PLoS One 6(12): e28425.

Cassagne, C., Cella, A.L., Suchon, P., Normand, A.C., Ranque, S. und Piarroux, R. (2013). Evaluation of four pretreatment procedures for MALDI-TOF MS yeast identification in the routine clinical laboratory. Med Mycol 51(4): 371-7.

CBS (2015). Centraalbureau voor Schimmelcultures. Utrecht, Niederlande; <http://www.cbs.knaw.nl/>; Zugriffsdatum 17.07.15.

Chanprasartsuk, O., Prakitchaiwattana, C. und Sanguandeeul, R. (2013). Comparison of Methods for Identification of Yeasts Isolated during Spontaneous Fermentation of Freshly Crushed Pineapple Juices. J Agric Res 15(Supplementary Issue): 1779-90.

Chen, J.H., Yam, W.C., Ngan, A.H., Fung, A.M., Woo, W.L., Yan, M.K., Choi, G.K., Ho, P.L., Cheng, V.C. und Yuen, K.Y. (2013). Advantages of using matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry as a rapid diagnostic tool for identification of yeasts and mycobacteria in the clinical microbiological laboratory. J Clin Microbiol 51(12): 3981-7.

Clark, A.E., Kaleta, E.J., Arora, A. und Wolk, D.M. (2013). Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry: a fundamental shift in the routine practice of clinical microbiology. Clin Microbiol Rev 26(3): 547-603.

Crandall, M.A. und Brock, T.D. (1968). Molecular basis of mating in the yeast *Hansenula wingei*. Bacteriol Rev 32(3): 139-63.

D'Amico, S., Collins, T., Marx, J.C., Feller, G. und Gerday, C. (2006). Psychrophilic microorganisms: challenges for life. EMBO Rep 7(4): 385-9.

Dainty, R.H., Edwards, R.A. und Hibbard, C.M. (1985). Time course of volatile compound formation during refrigerated storage of naturally contaminated beef in air. J Appl Bacteriol 59(4): 303-9.

Dainty, R.H., Edwards, R.A. und Hibbard, C.M. (1989). Spoilage of vacuum-packed beef by a *clostridium* sp. J Sci Food Agr 49: 473-86.

Dalluge, J.J. und Connell, L.B. (2013). On the potential of mass spectrometry-based metabolite profiling approaches to the study of biochemical adaptation in psychophilic yeast. *Extremophiles* 17(6): 953-61.

Dalton, H.K., Board, R.G. und Davenport, R.R. (1984). The yeasts of British fresh sausage and minced beef. *Anton Leeuw Int J G* 50(3): 227-48.

De Carolis, E., Posteraro, B., Lass-Flörl, C., Vella, A., Florio, A.R., Torelli, R., Girmenia, C., Colozza, C., Tortorano, A.M., Sanguinetti, M. und Fadda, G. (2012). Species identification of *Aspergillus*, *Fusarium* and *Mucorales* with direct surface analysis by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin Microbiol Inf* 18(5): 475-84.

De Carolis, E., Vella, A., Vaccaro, L., Torelli, R., Spanu, T., Fiori, B., Posteraro, B. und Sanguinetti, M. (2014). Application of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. *J Infect Dev Ctries* 8(9): 1081-88.

de Garcia, V., Brizzio, S., Libkind, D., Buzzini, P. und van Broock, M. (2007). Biodiversity of cold-adapted yeasts from glacial meltwater rivers in Patagonia, Argentina. *FEMS Microbiol Ecol* 59(2): 331-41.

De Lorenzo, V. (2011). Genes that move the window of viability of life: Lessons from bacteria thriving at the cold extreme. *BioEssays* 33(1): 38-42.

Deák, T. (1993). Simplified techniques for identifying foodborne yeasts. *Int J Food Microbiol* 19: 15-26.

Deák, T. (2004): Spoilage yeasts. In: R. J. C. Steele (Eds.). *Understanding and Measuring the Shelf-Life of Food*. CRC Press, Cambridge; 5, 91-110.

Deák, T. (2008). *Handbook of Spoilage Yeasts* T. Deák (Ed.), CRC Press, Boca Raton, London, New York; 2. Auflage, 45-46;.

Dhiman, N., Hall, L., Wohlfel, S.L., Buckwalter, S.P. und Wengenack, N.L. (2011). Performance and cost analysis of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for routine identification of yeast. *J Clin Microbiol* 49(4): 1614-6.

Dieckmann, R. und Malorny, B. (2011). Rapid screening of epidemiologically important *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovars by whole-cell matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Appl Environ Microbiol* 77(12): 4136-46.

Dorn-In, S., Holzel, C.S., Janke, T., Schwaiger, K., Balsliemke, J. und Bauer, J. (2013). PCR-SSCP-based reconstruction of the original fungal flora of heat-processed meat products. *Int J Food Microbiol* 162(1): 71-81.

Easterling, M.L., Colangelo, C.M., Scott, R.A. und Amster, I.J. (1998). Monitoring protein expression in whole bacterial cells with MALDI time-of-flight mass spectrometry. *Anal Chem* 70(13): 2704-9.

- Egan, A.F. (1983). Lactic acid bacteria of meat and meat products. *Anton Leeuw Int J G* 49(3): 327-36.
- Ercolini, D., Russo, F., Torrieri, E., Masi, P. und Villani, F. (2006). Changes in the spoilage-related microbiota of beef during refrigerated storage under different packaging conditions. *Appl Environ Microbiol* 72(7): 4663-71.
- Erl-Höning, C. (2014). Psychrotolerante Hefen in vakuumverpacktem Fleisch. Dissertation. Tierärztliche Fakultät, Veterinärwissenschaftliches Department, LMU München.
- Fagerquist, C.K., Miller, M.G., Harden, L.A., Bates, A.H., Vensel, W.H., Wang, G. und Mandrell, R.E. (2005). Genomic and proteomic identification of a DNA-binding protein used in the "fingerprinting" of *campylobacter* species and strains by MALDI-TOF-MS protein biomarker analysis. *Anal Chem* 77: 4897-907.
- Fehlhaber, K. (2004): Verderb. In: H.-J. Sinell (Eds.). Einführung in die Lebensmittelhygiene. Parey Verlag, Stuttgart; 4. Auflage, Kapitel 3, 107-21.
- Feller, G. und Gerday, C. (2003). Psychrophilic enzymes: hot topics in cold adaptation. *Nat Rev Micro* 1(3): 200-08.
- Fleet, G. (1992). Spoilage yeasts. *Crit Rev Biotechnol* 12(1-2): 1-44.
- Gedek, B. (2007): Allgemeine Mykologie. In: M. Rolle und A. Mayr (Eds.). Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre. Enke Verlag, Stuttgart; 8. Auflage, Kapitel 6, 559-83.
- Giebel, R., Worden, C., Rust, S.M., Kleinheinz, G.T., Robbins, M. und Sandrin, T.R. (2010). Microbial Fingerprinting using Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS): Applications and Challenges. *Adv Appl Microbiol* 71: 149-84.
- Gill, C.O. und Newton, K.G. (1978). The ecology of bacterial spoilage of fresh meat at chill temperatures. *Meat Sci* 2(3): 207-17.
- Gimeno, C.J., Ljungdahl, P.O., Styles, C.A. und Fink, G.R. (1993): Characterization of *Saccharomyces cerevisiae* pseudohyphal growth. In: H. Vanden Bossche, F. C. Odds und D. Kerridge (Eds.). Dimorphic Fungi in Biology and Medicine. Springer US, Boston; 83-103.
- Gladfelter, A. und Berman, J. (2009). Dancing genomes: fungal nuclear positioning. *Nat Rev Microbiol* 7(12): 875-86.
- Gomaa, N.F., El-Derea, H.B. und El, I.A.E. (2003). Hazard analysis and critical point identification at Abiss slaughter house in Alexandria. *J Egypt Public Health Assoc* 78(3-4): 287-303.

Gorton, R.L., Seaton, S., Ramnarain, P., McHugh, T.D. und Kibbler, C.C. (2014). Evaluation of a short, on-plate formic acid extraction method for matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry-based identification of clinically relevant yeast isolates. *J Clin Microbiol* 52(4): 1253-5.

Goyer, M., Lucchi, G., Ducoroy, P., Vagner, O., Bonnin, A. und Dalle, F. (2012). Optimization of the preanalytical steps of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry identification provides a flexible and efficient tool for identification of clinical yeast isolates in medical laboratories. *J Clin Microbiol* 50(9): 3066-8.

Gray, L.D. und Roberts, G.D. (1988). Laboratory diagnosis of systemic fungal diseases. *Infect Dis Clin North Am* 2(4): 779-803.

Hart, P.J., Wey, E., McHugh, T.D., Balakrishnan, I. und Belgacem, O. (2015). A method for the detection of antibiotic resistance markers in clinical strains of *Escherichia coli* using MALDI mass spectrometry. *J Microbiol Meth* 111: 1-8.

Hettick, J.M., Green, B.J., Buskirk, A.D., Kashon, M.L., Slaven, J.E., Janotka, E., Blachere, F.M., Schmechel, D. und Beezhold, D.H. (2008). Discrimination of *Penicillium* isolates by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry fingerprinting. *Rap Commun Mass Spectrom* 22(16): 2555-60.

Hibbett, D., Binder, M., Bischoff, J., Blackwell, M., Cannon, P.F., Eriksson, O.E., Huhndorf, S., James, T., Kirk, P.M., Lücking, R., Thorsten Lumbsch, H., Lutzoni, F., Matheny, P.B., McLaughlin, D.J., Powell, M.J., Redhead, S., Schoch, C.L., Spatafora, J.W., Stalpers, J.A., Vilgalys, R., Aime, M.C., Aptroot, A., Bauer, R., Begerow, D., Benny, G.L., Castlebury, L.A., Crous, P.W., Dai, Y.-C., Gams, W., Geiser, D.M., Griffith, G.W., Gueidan, C., Hawksworth, D.L., Hestmark, G., Hosaka, K., Humber, R.A., Hyde, K.D., Ironside, J.E., Kõljalg, U., Kurtzman, C.P., Larsson, K.-H., Lichtwardt, R., Longcore, J., Miądlikowska, J., Miller, A., Moncalvo, J.-M., Mozley-Standridge, S., Oberwinkler, F., Parmasto, E., Reeb, V., Rogers, J.D., Roux, C., Ryvarden, L., Sampaio, J.P., Schüßler, A., Sugiyama, J., Thorn, R.G., Tibell, L., Untereiner, W.A., Walker, C., Wang, Z., Weir, A., Weiss, M., White, M.M., Winka, K., Yao, Y.-J. und Zhang, N. (2007). A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycol Res* 111(5): 509-47.

Hillenkamp, F. und Karas, M. (2000). Matrix-assisted laser desorption/ionisation, an experience. *Int J Mass Spectrom* 200(1-3): 71-77.

Horikoshi, K., Antranikian, G., Bull, A.T., Robb, F.T. und Stetter, K.O. (2011). *Extremophiles Handbook*. Horikoshi (Ed.), Springer Verlag, Tokyo; 5.

Iriart, X., Lavergne, R.A., Fillaux, J., Valentin, A., Magnaval, J.F., Berry, A. und Cassaing, S. (2012). Routine identification of medical fungi by the new Vitek MS matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight system with a new time-effective strategy. *J Clin Microbiol* 50(6): 2107-10.

Ismail, S.A., Deak, T., El-Rahman, H.A., Yassien, M.A. und Beuchat, L.R. (2000). Presence and changes in populations of yeasts on raw and processed poultry products stored at refrigeration temperature. *Int J Food Microbiol* 62(1-2): 113-21.

- Jadhav, S., Gulati, V., Fox, E.M., Karpe, A., Beale, D.J., Sevier, D., Bhawe, M. und Palombo, E.A. (2015). Rapid identification and source-tracking of *Listeria monocytogenes* using MALDI-TOF mass spectrometry. *Int J Food Microbiol* 202: 1-9.
- James, S.A., Carvajal Barriga, E.J., Portero Barahona, P., Nueno-Palop, C., Cross, K., Bond, C.J. und Roberts, I.N. (2015). *Kazachstania yasuniensis* sp. nov., an ascomycetous yeast species found in mainland Ecuador and on the Galapagos. *Int J Syst Evol Microbiol* 65(4): 1304-9.
- Kaben, U. (2005): Mikrobiologische Diagnostik im Liquor bei Pilzinfektionen. In: U. K. Zettl, R. Lehmitz und E. Mix (Eds.). *Klinische Liquordiagnostik*. de Gruyter, Berlin; 2. Auflage, 6, 326.
- Kabisch, J., Ziegler, E., Staufenbiel, A., Hechelmann, H., Pichner, R. und Gareis, M. (2010). Isolation and identification of psychrotrophic yeasts from vacuum-packed beef. . *Mittl. Fleischforsch. Kulmb.* 49: 197-206.
- Kabisch, J., Höning, C., Bohnlein, C., Pichner, R., Gareis, M. und Wenning, M. (2013). *Kazachstania psychrophila* sp. nov., a novel psychrophilic yeast isolated from vacuum-packed beef. *Anton Leeuw Int J G* 104(6): 925-31.
- Kabisch, J., Erl-Höning, C., Wenning, M., Böhnlein, C., Gareis, M. und Pichner, R. (2016). Spoilage of vacuum-packed beef by the yeast *Kazachstania psychrophila*. *Food Microbiol* 53, Part B: 15-23.
- Kapteyn, J.C., ter Riet, B., Vink, E., Blad, S., De Nobel, H., Van Den Ende, H. und Klis, F.M. (2001). Low external pH induces HOG1-dependent changes in the organization of the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. *Mol Microbiol* 39(2): 469-79.
- Karas, M., Bachmann, D., Bahr, U. und Hillenkamp, F. (1987). Matrix-assisted ultraviolet laser desorption of non-volatile compounds. *Int J Mass Spectrom* 78: 53-68.
- Klis, F.M., Mol, P., Hellingwerf, K. und Brul, S. (2002). Dynamics of cell wall structure in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Rev* 26(3): 239-56.
- Kollar, R., Reinhold, B.B., Petrakova, E., Yeh, H.J., Ashwell, G., Drgonova, J., Kapteyn, J.C., Klis, F.M. und Cabib, E. (1997). Architecture of the yeast cell wall. Beta(1->6)-glucan interconnects mannoprotein, beta(1->3)-glucan, and chitin. *J Biol Chem* 272(28): 17762-75.
- Komagata, K. und Nakase, T. (1965). New species of the genus *Candida* isolated from frozen foods. *J Gen Appl Microbiol* 11(3): 255-67.
- Koutsoumanis, K.P., Stamatiou, A., Skandamis, P.N. und Nychas, G.-J.E. (2006). Development of a Microbial Model for the Combined Effect of Temperature and pH on Spoilage of Ground Meat, and Validation of the Model under Dynamic Temperature Conditions. *Appl Environ Microbiol* 72(1): 124-34.

Kurtzman, C.P. und Robnett, C.J. (1998). Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Anton Leeuw Int J G* 73(4): 331-71.

Kurtzman, C.P., Robnett, C.J. und Basehoar-Powers, E. (2008). Phylogenetic relationships among species of *Pichia*, *Issatchenkia* and *Williopsis* determined from multigene sequence analysis, and the proposal of *Barnettozyma* gen. nov., *Lindnera* gen. nov. and *Wickerhamomyces* gen. nov. *FEMS Yeast Res* 8(6): 939-54.

Kurtzman, C.P., Fell, J.W. und Boeckhout, T. (2011). *The Yeasts, A taxonomic Study*. C. P. Kurtzman, J. W. Fell und T. Boeckhout (Ed.), Elsevier, San Diego; 5. Auflage, 53-55; 61; 88- 116; 439-470.

Lautenschläger, R. (2012). Aktuelle Trends bei der Rindfleischreifung – Trocken- und Vakuumreifung im Vergleich. *Mittl. Fleischforsch. Kulmb.* 47

Leaw, S.N., Chang, H.C., Sun, H.F., Barton, R., Bouchara, J.P. und Chang, T. (2006). Identification of Medically Important Yeast Species by Sequence Analysis of the Internal Transcribed Spacer Regions. *J Clin Microbiol* 44(3): 693-99.

Libkind, D., Brizzio, S., Ruffini, A., Gadanho, M., van Broock, M. und Sampaio, J.P. (2003). Molecular characterization of carotenogenic yeasts from aquatic environments in Patagonia, Argentina. *Anton Leeuw Int J G* 84(4): 313-22.

Lottspeich, F. (2006): Massenspektrometrie. In: F. Lottspeich und J. W. Engels (Eds.). *Bioanalytik*. Elsevier, München; 2. Auflage, Kapitel 15, 329-51.

Mannazzu, I., Landolfo, S., Lopes da Silva, T. und Buzzini, P. (2015). Red yeasts and carotenoid production: outlining a future for non-conventional yeasts of biotechnological interest. *World J Microbiol Biotechnol* 31(11): 1665-73.

Margesin, R., Fonteyne, P.A., Schinner, F. und Sampaio, J.P. (2007a). *Rhodotorula psychrophila* sp. nov., *Rhodotorula psychrophenolica* sp. nov. and *Rhodotorula glacialis* sp. nov., novel psychrophilic basidiomycetous yeast species isolated from alpine environments. *Int J Syst Evol Microbiol* 57(Pt 9): 2179-84.

Margesin, R., Neuner, G. und Storey, K.B. (2007b). Cold-loving microbes, plants, and animals-fundamental and applied aspects. *Naturwissenschaften* 94(2): 77-99.

Margesin, R. und Miteva, V. (2011). Diversity and ecology of psychrophilic microorganisms. *Res Microbiol* 162(3): 346-61.

Marklein, G., Josten, M., Klanke, U., Muller, E., Horre, R., Maier, T., Wenzel, T., Kostrzewa, M., Bierbaum, G., Hoerauf, A. und Sahl, H.G. (2009). Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for fast and reliable identification of clinical yeast isolates. *J Clin Microbiol* 47(9): 2912-7.

- Martin, K.J. und Rygiewicz, P.T. (2005). Fungal-specific PCR primers developed for analysis of the ITS region of environmental DNA extracts. *BMC microbiology* 5(1): 28.
- Mazzeo, M.F., Degiulio, B., Guerriero, G., Ciarcia, G., Malorni, A., Luigirusso, G. und Siciliano, R.A. (2008). Fish Authentication by MALDI-TOF Mass Spectrometry. *J Agric Food Chem* 56: 11071–76.
- Mellmann, A., Bimet, F., Bizet, C., Borovskaya, A.D., Drake, R.R., Eigner, U. und Harmsen, D. (2009). High Interlaboratory Reproducibility of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry-Based Species Identification of nonfermenting Bacteria. *J Clin Microbiol* 47(11): 3732–34.
- Mendonca-Previato, L., Burke, D. und Ballou, C.E. (1982). Sexual agglutination factors from the yeast *Pichia amethionina*. *J Cell Biochem* 19(2): 171-8.
- Money, N. (2016). *The FungiS*. Watkinson, L. Boddy und N. Money (Ed.), Elsevier, Oxford; 3. Auflage,
- Montrocher, R., Verner, M.C., Briolay, J., Gautier, C. und Marmeisse, R. (1998). Phylogenetic analysis of *Saccharomyces cerevisiae* group based on polymorphisms of rDNA spacer sequences. *Int J Syst Bacteriol* 48: 295-303.
- Moreira, S.R., Schwan, R.F., Carvalho, E.P.d. und Wheals, A.E. (2001). Isolation and identification of yeasts and filamentous fungi from yoghurts in Brazil. *Braz J Microbiol* 32(2): 117-22.
- Moschonas, G., Bolton, D.J., Sheridan, J.J. und McDowell, D.A. (2009). Isolation and sources of 'blown pack' spoilage clostridia in beef abattoirs. *J Appl Microbiol* 107(2): 616-24.
- Mycobank (2015). Mycobankdatabase-Fungal Databases, Nomenclature & Species Banks. Utrecht; Niederlande; <http://www.mycobank.org/>; Zugriffsdatum 28.03.15.
- NCBI (2015). National Center of Biotechnology Information. Rockville Pike Thedesda, USA; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>; Zugriffsdatum 07.08.15.
- Nielsen, D.S., Jacobsen, T., Jespersen, L., Koch, A.G. und Arneborg, N. (2008). Occurrence and growth of yeasts in processed meat products – Implications for potential spoilage. *Meat Sci* 80(3): 919-26.
- Northcutt, J., Jones, D., Ingram, K., Hinton, A. und Musgrove, M. (2004). Airborne microorganisms in commercial shell egg processing facilities. *Inter J Poultry Sci* 3(3): 195-200.
- Nychas, G.-J.E., Skandamis, P.N., Tassou, C.C. und Koutsoumanis, K.P. (2008). Meat spoilage during distribution. *Meat Sci* 78: 77-89.

Ozturk, I. und Sagdic, O. (2014). Biodiversity of yeast mycobiota in "sucuk," a traditional Turkish fermented dry sausage: phenotypic and genotypic identification, functional and technological properties. *J Food Sci* 79(11): M2315-22.

Paniora, C. (2014). Untersuchungen zur psychrophilen Hefemikrobiota auf frischen, vakuumverpackten Fleischstücken aus dem globalen Handel. Dissertation. Tierärztliche Fakultät, Veterinärwissenschaftliches Department, LMU München.

Pavlovic, M., Mewes, A., Maggipinto, M., Schmidt, W., Messelhäuser, U., Balsliemke, J., Hörmansdorfer, S., Busch, U. und Huber, I. (2014). MALDI-TOF MS based identification of food-borne yeast isolates. *J Microbiol Meth* 106: 123-28.

Phadtare, S. (2004). Recent developments in bacterial cold-shock response. *Curr Issues Mol Biol* 6(2): 125-36.

Pinto, A., Halliday, C., Zahra, M., van Hal, S., Olma, T., Maszewska, K., Iredell, J.R., Meyer, W. und Chen, S.C. (2011). Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry identification of yeasts is contingent on robust reference spectra. *PLoS One* 6(10): 13.

Qian, J., Cutler, J.E., Cole, R.B. und Cai, Y. (2008). MALDI-TOF mass signatures for differentiation of yeast species, strain grouping and monitoring of morphogenesis markers. *Anal Bioanal Chem* 392(3): 439-49.

Quirós, M., Martorell, P., Amparo, Q., Eladio, B., Peinado, J.M. und De Sioniz, M.I. (2008). Four new *Candida cretensis* strains isolated from Spanish fermented sausages (chorizo): Taxonomic and phylogenetic implications. *FEMS Yeast Res* 8(3): 485-91.

Robinson, C.H. (2001). Cold adaptation in Arctic and Antarctic fungi. *New Phytologist* 151(2): 341-53.

Ruiz-Herrera, J. und Ortiz-Castellanos, L. (2010). Analysis of the phylogenetic relationships and evolution of the cell walls from yeasts and fungi. *FEMS Yeast Res* 10(3): 225-43.

Russell, N.J. (2008): Membrane Components and Cold Sensing. In: R. Margesin, F. Schinner, J.-C. Marx und C. Gerday (Eds.). *Psychrophiles: from Biodiversity to Biotechnology*. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg; 11, 177-90.

Santos, C., Lima, N., Sampaio, P. und Pais, C. (2011). Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight intact cell mass spectrometry to detect emerging pathogenic *Candida* species. *Diagn Microbiol Infect Dis* 71(3): 304-8.

Sauer, S., Freiwald, A., Maier, T., Kube, M., Reinhardt, R., Kostrzewa, M. und Geider, K. (2008). Classification and identification of bacteria by mass spectrometry and computational analysis. *PLoS One* 3(7): e2843.

Schneider, K.R., Parish, M.E. und Joy, J. (2006): Conventional Microbial Testing Methods and Microscopy Techniques. In: Y. H. Hui und F. Sherkat (Eds.). Handbook of Food Science, Technology and Engineering. Taylor & Francis Ltd, London; 4. Auflage, Kapitel 185.4, 3230.

Schubert, S. und Wieser, A. (2011). Einsatz der Matrix-Assisted Laser Desorption/ionisation-Time of Flight Massenspektrometrie (MALDI-TOF MS) in der mikrobiologischen Routinediagnostik/Matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) in clinical microbiological routine diagnostics. Lab Med 35(4): 195-203.

Senses-Ergul, S., Ágoston, R., Belák, Á. und Deák, T. (2006). Characterization of some yeasts isolated from foods by traditional and molecular tests. Int J Food Microbiol 108(1): 120-24.

Shivaji, S., Bhadra, B., Rao, R.S. und Pradhan, S. (2008). *Rhodotorula himalayensis* sp. nov., a novel psychrophilic yeast isolated from Roopkund Lake of the Himalayan mountain ranges, India. Extremophiles 12(3): 375-81.

Slessareva, J.E. und Dohlman, H.G. (2006). G Protein Signaling in Yeast: New Components, New Connections, New Compartments. Science 314(5804): 1412-13.

Spencer, J., Rawling, S., Stratford, M., Steels, H., Novodvorska, M., Archer, D.B. und Chandra, S. (2011). Yeast identification: reassessment of assimilation tests as sole universal identifiers. Lett Appl Microbiol 53(5): 503-08.

Stevenson, L.G., Drake, S.K., Shea, Y.R., Zelazny, A.M. und Murray, P.R. (2010). Evaluation of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for identification of clinically important yeast species. J Clin Microbiol 48(10): 3482-6.

Stone, J.K., Polishook, J.D. und White, J.F. (2004): Endolithic fungi. In: G. M. Müller, G. F. Bills und M. S. Foster (Eds.). Biodiversity of Fungi. Inventory and Monitoring Methods. Elsevier, Amsterdam; 241-70.

Struvay, C. und Feller, G. (2012). Optimization to low temperature activity in psychrophilic enzymes. Int J Mol Sci 13(9): 11643-65.

Tanaka, K., Waki, H., Ido, Y., Akita, S. und Yoshida, Y. (1988). Protein and Polymer Analyses up to m/z 100 000 by Laser Ionization Time-of-flight Mass Spectrometry Rapid Commun Mass Spectrom 2(8): 151-53.

Thomas-Hall, S.R., Turchetti, B., Buzzini, P., Branda, E., Boekhout, T., Theelen, B. und Watson, K. (2010). Cold-adapted yeasts from Antarctica and the Italian Alps-description of three novel species: *Mrakia robertii* sp. nov., *Mrakia blollopis* sp. nov. and *Mrakiella niccombsii* sp. nov. Extremophiles 14(1): 47-59.

Usbeck, J.C., Kern, C., Vogel, R.F. und Behr, J. (2013). Optimization of experimental and modelling parameters for the differentiation of beverage spoiling yeasts by Matrix-Assisted-

- Laser-Desorption/Ionization–Time-of-Flight Mass Spectrometry (MALDI–TOF MS) in response to varying growth conditions. *Food Microbiol* 36(2): 379-87.
- van Veen, S.Q., Claas, E.C. und Kuijper, E.J. (2010). High-throughput identification of bacteria and yeast by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry in conventional medical microbiology laboratories. *J Clin Microbiol* 48(3): 900-7.
- Vargha, M., Takats, Z., Konopka, A. und Nakatsu, C.H. (2006). Optimization of MALDI-TOF MS for strain level differentiation of *Arthrobacter* isolates. *J Microbiol Methods* 66(3): 399-409.
- Vaughan-Martini, A. und Lachance, M.-A. (2011): *Kazachstania Zubkova*. In: C. Kurtzman, J. Fell und T. Boekhout (Eds.). *The Yeasts, A taxonomic study*. Elsevier, London; 5. Auflage, 439-70.
- Villar, J.M., Delgado, J.D.J. und Velasco, C.G. (2012). Fungemia due to *Rhodotorula mucilaginosa* in an immunocompetent, critically ill patient. *Journal of Infection and Chemotherapy* 18(4): 581-83.
- Vlek, A., Kolecka, A., Khayhan, K., Theelen, B., Groenewald, M., Boel, E. und Boeckhout, T. (2014). Inter-laboratory comparison of sample preparation methods, database expansion and cut-off values in the identification of yeasts by MALDI-TOF mass spectrometry using a yeast test panel. *J Clin Microbiol*: 1-27.
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S. und Taylor, J. (1990): Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky und J. F. White (Eds.). *PCR protocols: a guide to methods and applications*. Academic Press, San Diego; 315-22.
- Wickerham, L.J. (1951). *Taxonomy of yeasts*. U.S. Department of Agriculture, Washington DC; 1029;
- Wickerham, L.J. und Burton, K.A. (1954). A clarification of the relationships of *Candida guilliermondii* to other yeasts by a study of their mating types. *J Bacteriol* 68: 594–97.
- Wieser, A., Schneider, L., Jung, J. und Schubert, S. (2012). MALDI-TOF MS in microbiological diagnostics-identification of microorganisms and beyond (mini review). *Appl Microbiol Biotechnol* 93(3): 965-74.
- Wu, Z.W. und Bai, F.Y. (2005). *Kazachstania aquatica* sp. nov. and *Kazachstania solicola* sp. nov., novel ascomycetous yeast species. *Int J Syst Evol Microbiol* 55(Pt 5): 2219-24.
- Xin, M.X. und Zhou, P.J. (2007). *Mrakia psychrophila* sp. nov., a new species isolated from Antarctic soil. *J Zhejiang Univ Sci B* 8(4): 260-5.
- Zaragoza, O. und Gancedo, J.M. (2000). Pseudohyphal growth is induced in *Saccharomyces cerevisiae* by a combination of stress and cAMP signalling. *Anton Leeuw Int J G* 78(2): 187-94.

Zubkova, R. (1971). Genus novum *Saccharomycetacearum* e *Kazachstania*. Bot. Mat. Gerb. Inst. Bot. AN. Kazakh. SSR 7: 53-56.

Verwendete Rechtstexte:

Verordnung (EG) Nr. 178/2002 des Europäischen Parlamentes und des Rates vom 28. Januar 2002 zur Festlegung der allgemeinen Grundsätze und Anforderungen des Lebensmittelrechts, zur Einrichtung der Europäischen Behörde für Lebensmittelsicherheit und zur Festlegung von Verfahren zur Lebensmittelsicherheit. EU-Basisverordnung zur Lebensmittelhygiene; Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaften L31/1 vom 01.02.2002.

9 TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1:	Zusammenfassende Darstellung über die Isolierung strikt psychrophiler Hefen aus Lebensmitteln	9
Tabelle 2:	Übersicht zu den physiologischen Eigenschaften von <i>K. psychrophila</i> nach Kabisch et al. (2013) im Vergleich zu anderen <i>Kazachstania</i> spp.	14
Tabelle 3:	Bedeutung der ermittelten Summenwerte durch die Software Biotyper OC (Bruker Daltoniks) nach Anonymous (2012)	26
Tabelle 4:	Literaturübersicht zu Untersuchungen humanpathogener und lebensmittelassoziierter Hefen mittels MALDI-TOF-MS	28
Tabelle 5:	Übersicht über bisher beschriebene Präparationsmethoden zur massenspektrometrischen Messung von Hefen und Schimmelpilzen	29
Tabelle 6:	Effekte der Wachstumsbedingungen auf Masse der Zellwand, Chitingehalt, Mannan, β -Glucan, β -1,6-Glucan und auf die Sensitivität intakter Zellen auf Zymolase {Aguilar-Uscanga, 2003}	35
Tabelle 7:	Herkunft der untersuchten psychrophilen Hefe-Isolate	38
Tabelle 8:	Übersicht über die verwendeten Hefe-Referenzstämme	39
Tabelle 9:	Übersicht über die verwendeten Hefe-Isolate und Referenzstämme für die Exklusivitätsprüfung	40
Tabelle 10:	Beurteilungskriterien für die kolonimorphologische Beurteilung (Kurtzman et al., 2011)	42
Tabelle 11:	Mastermixherstellung für die PCR (Primer NL1/4) zur Sequenzierung von Hefen (Erl-Höning, 2014)	44
Tabelle 12:	Mastermixherstellung für die PCR (Primer ITS1/4) zur Sequenzierung von Hefen (Paniora, 2014)	44
Tabelle 13:	PCR-Cyclerprotokoll für die DNA-Amplifikation von Hefen zur Sequenzierung (Primer NL1/4) (Erl-Höning, 2014)	45
Tabelle 14:	PCR-Cyclerprotokoll für die DNA-Amplifikation von Hefen zur Sequenzierung (Primer ITS1/4) (Paniora, 2014)	45
Tabelle 15:	Verwendete Grundeinstellungen für die Messung der Hefen mit MALDI-TOF-MS	48
Tabelle 16:	Temperaturabhängiges Wachstum der Referenzstämme auf Columbia-Schafblut-Agar (CBA)	58
Tabelle 17:	Übersicht über die morphologischen Eigenschaften des Referenzstamms <i>K. psychrophila</i> DSM 26230 und der untersuchten Hefe-Isolate auf CBA nach verschiedenen Inkubationszeiten bei +10 °C	65
Tabelle 18:	Übersicht über die morphologischen Eigenschaften des Referenzstamms <i>K. psychrophila</i> DSM 26230 und der untersuchten Hefe-Isolate auf MEA ⁺ nach verschiedenen Inkubationszeiten bei +10 °C	66

Tabelle 19:	Übersicht über die morphologischen Eigenschaften des Referenzstamms <i>K. psychrophila</i> DSM 26230 und der untersuchten Hefe-Isolate auf GYP-Agar nach verschiedenen Inkubationszeiten bei +10 °C	69
Tabelle 20:	Übersicht über die morphologischen Eigenschaften des Referenzstamms <i>K. psychrophila</i> DSM 26230 und der untersuchten Hefe-Isolate auf YGC-Agar nach verschiedenen Inkubationszeiten bei +10 °C	71
Tabelle 21:	Übersicht über die morphologischen Eigenschaften des Referenzstamms <i>K. psychrophila</i> DSM 26230 und der untersuchten Hefe-Isolate auf Sabouraud-Agar nach verschiedenen Inkubationszeiten bei +10 °C.....	73
Tabelle 22:	Biochemisches Profil der untersuchten Wildstämme im Vergleich zu <i>K. psychrophila</i> DSM 26230	80
Tabelle 23:	Übersicht zur Auswertung der Massenspektren in Abhängigkeit der verwendeten Nährmedien für <i>C. albicans</i> ATCC 10231.....	87
Tabelle 24:	Übersicht über die Variation der Peakintensitäten in Abhängigkeit des Nährmediums für <i>K. psychrophila</i> DSM 26230.....	91
Tabelle 25:	Übersicht zur Auswertung der Massenspektren in Abhängigkeit der verwendeten Nährmedien für <i>K. psychrophila</i> DSM 26230.....	91
Tabelle 26:	Ergebnisse der Variation der Einwirkzeit von Ameisensäure (70 %)	94
Tabelle 27:	Ergebnisse der Variation der Anzuchtbedingungen von <i>K. lodderae</i> CBS 2757	96
Tabelle 28:	Zusammenfassende Darstellung der Versuche zur Messbarkeit von <i>K. lodderae</i>	102
Tabelle 29:	Identifikationsreport der <i>Kazachstania</i> -Referenzstämme und <i>Mrakia</i> -Referenzstämme durch Abgleich mit den Daten plus der selbst erstellten Referenzspektren mit der Software Biotyper 3.1.66 OC™ (Bruker Daltoniks); Präparationsmethode: Proteinextraktion mit Ethanol (100 %) und Ameisensäure (70 %).	105
Tabelle 30:	Identifikationsreport der Isolate durch Abgleich mit den Daten plus der selbst erstellten Referenzspektren mit der Software Biotyper 3.1.66 OC™ (Bruker Daltoniks); Präparationsmethode: Proteinextraktion mit Ethanol (100 %) und Ameisensäure (70 %).	106
Tabelle 31:	Identifikationsreport der <i>Kazachstania</i> spp. durch Abgleich mit den Daten plus der selbst erstellten Referenzspektren mit der Software Biotyper 3.1.66™ (Bruker Daltoniks); Präparationsmethode: Yeast-On-Target-Lysis (YOTL)	107
Tabelle 32:	Identifikationsreport der Spezifitätsprüfung, Biotyper 3.1.66 OC™ (Bruker Daltoniks): Identifizierung aus Fleisch isolierter Hefen (Paniora, 2014) durch Abgleich mit den selbst erstellten Referenzspektren incl. der kommerziellen Datenbank; keine Fehlidentifikationen mit <i>Kazachstania</i> spp. bzw. <i>Mrakia</i> spp	112
Tabelle 33:	Massenunterschiede von <i>K. lodderae</i> CBS 2757 und <i>K. psychrophila</i> DSM 26230	115
Tabelle 34:	Gemeinsame Massen der psychrophilen Hefen <i>K. psychrophila</i> DSM 26230, <i>M. frigida</i> DSM 4634 und <i>M. gelida</i> DSM 70882.....	119

Tabelle 35:	Unterschiede der relativen Intensitäten der Isolate aus frischen und aus verdorbenen Fleischproben im Massenbereich von 6150 – 6970 Da	121
Tabelle 36:	Darstellung der Beziehungen biochemischer Gruppen zum Isolatusprung.	124
Tabelle 37:	Zusammenfassung der Massenunterschiede zwischen <i>K. lodderae</i> CBS 2757 und <i>K. psychrophila</i> DSM 26230 und der Gemeinsamkeiten zu <i>Mrakia</i> spp.	126
Tabelle 38:	Herkunft der Wildstämme mit Information über Tierart, Verpackungsart und Ursprungsland	165
Tabelle 39:	Massenliste von <i>K. lodderae</i> CBS 2757, <i>K. psychrophila</i> DSM 26230, <i>M. gelida</i> DSM 70882 und <i>M. frigida</i> DSM 4634.....	171

10 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Systematische Einteilung des Reiches der Pilze nach Gedek (2007), Hibbett et al. (2007) und Money (2016).....	2
Abbildung 2: Wachstumsfähigkeit von Mikroorganismen in Abhängigkeit von der Umgebungstemperatur (nach De Lorenzo, 2011)	4
Abbildung 3: Abhängigkeit der Aktivität psychrophiler (transparente Kreise) und mesophiler (geschwärzte Kreise) Enzyme von der Temperatur (Struvay und Feller, 2012) 6	
Abbildung 4: Inaktivierung (oben) und Entfaltung (unten) psychrophiler (blau) und mesophiler (schwarz) Enzyme (Struvay und Feller, 2012)	7
Abbildung 5: (a) Phasenkontrastmikroskopische Aufnahme nach Inkubation über 8 Tage bei +10 °C auf Malz-Extrakt-Agar (MEA), Ascus mit 4 Ascosporen (Kabisch et al., 2013); (b) Elektronenmikroskopische Aufnahme von <i>K. psychophila</i> während der Knospung nach einer Inkubationszeit von 10 Tagen bei +10 °C auf Hefeextrakt-Glucose-Chloramphenicol-Agar (YGC) (Kabisch et al., 2013)	13
Abbildung 6: Unipolares Budding. Darstellung des mitotischen Zellzyklus am Beispiel von <i>S. cerevisiae</i> (Gladfelter und Berman, 2009)	18
Abbildung 7: Vergleichende Darstellung (a) echter Hyphen von <i>Galactomyces geotrichum</i> (Maßstab 20 µm) und (b) Pseudohyphen von <i>Issatchenkia orientalis</i> (anamorph <i>C. krusei</i> , Maßstab 10 µm) (Deák, 2004).....	19
Abbildung 8: Lichtmikroskopische Aufnahmen unterschiedlicher Formen der Ascosporen; (a) persistierende Asci mit kugelförmigen Ascosporen (<i>Schwanniomyces pseudopolymorphus</i>); (b) Ascus mit spheroidaler Ascospore (<i>Kazachstania pintolopesii</i>); (c) saturnartige Ascosporen in sich auflösenden Asci (<i>Saturnispora ahearnii</i>); (d) sich auflösende Asci mit birnenförmigen Ascosporen (<i>Kluyveromyces marxianus</i>) (Kurtzman et al., 2011)	20
Abbildung 9: Schematische Darstellung eines MALDI-TOF-MS (nach Lottspeich (2006)). TOF: Time of Flight; m/z: Masse-zu-Ladungs-Verhältnis.....	24
Abbildung 10: MALDI-TOF-Spektren für unterschiedliche Stämme von <i>C. albicans</i> auf Glucose-Hefeextrakt-Pepton-Agar; stammabhängige Massenunterschiede in Abhängigkeit der Anzuchtbedingungen (blaue Markierungen) (Qian et al., 2008)	36
Abbildung 11: Übersicht zum Ursprung der untersuchten Hefe-Isolate.....	37
Abbildung 12: Vorgehen für die Überprüfung der Relevanz des verwendeten Nährmediums für die Reproduzierbarkeit der Massenspektren am Beispiel <i>C. albicans</i> ATCC 10231. CBA: Columbia-Schafblut-Agar; MEA ⁺ : Malz-Extrakt-Agar plus Novobiocin; GYP: Glucose-Hefeextrakt-Pepton-Agar; YGC: Hefeextrakt-Glucose-Chloramphenicol-Agar; SAB: Sabouraud-Agar; EtOH: Ethanol (100 %); FA: Ameisensäure (70 %); m/z: Masse-zu-Ladungs-Verhältnis	50
Abbildung 13: Vorgehen bei der Extraktion von <i>K. lodderae</i> CBS 2757 mit Ethanol (EtOH) (100 %) und Ameisensäure (FA) (70 %) unter verlängerter Einwirkzeit (EWZ) 52	

- Abbildung 14: Vergleichende Darstellung der *Kazachstania*-Referenzstämme nach aerober Inkubation bei +4 °C auf Columbia-Schafblut-Agar über 14 Tage. (a) *K. psychrophila* DSM 26230; (b) *K. servazzii* CBS 4311; (c) *K. lodderae* CBS 2757; (d) *K. unispora* CBS 398; (c)+(d) zeigen kein Wachstum 59
- Abbildung 15: Vergleichende Darstellung der *Kazachstania*-Referenzstämme nach aerober Inkubation bei +10 °C auf Columbia-Schafblut-Agar über 14 Tage. (a) *K. psychrophila* DSM 26230; (b) *K. servazzii* CBS 4311; (c) *K. lodderae* CBS 2757; (d) *K. unispora* CBS 398 59
- Abbildung 16: Vergleichende Darstellung der *Kazachstania*-Referenzstämme nach aerober Inkubation bei +20 °C auf Columbia-Schafblut-Agar über 14 Tage. (a) *K. psychrophila* DSM 26230 ohne Wachstum; (b) *K. servazzii* CBS 4311; (c) *K. lodderae* CBS 2757; (d) *K. unispora* CBS 398..... 60
- Abbildung 17: Vergleichende Darstellung der *Kazachstania*-Referenzstämme nach aerober Inkubation bei +25 °C auf Columbia-Schafblut-Agar über 14 Tage. (a) *K. psychrophila* DSM 26230 ohne Wachstum; (b) *K. servazzii* CBS 4311; (c) *K. lodderae* CBS 2757; (d) *K. unispora* CBS 398..... 60
- Abbildung 18: Morphologischer Vergleich der Einzelkolonien von (a) *K. psychrophila* DSM 26230; (b) *K. servazzii* CBS 4311; (c) *K. lodderae* CBS 2757 und (d) *K. unispora* CBS 398 nach Kultivierung über 14 Tage bei +20 °C (bzw. +10 °C für *K. psychrophila*) auf Columbia-Schafblut-Agar..... 62
- Abbildung 19: Morphologischer Vergleich der Einzelkolonien von *K. lodderae* CBS 2757 nach aerober Kultivierung über 14 Tage bei (a) +10 °C und (b) +20 °C auf Columbia-Schafblut-Agar 63
- Abbildung 20: Morphologischer Vergleich von (a) *K. psychrophila* DSM 26230; (b) *K. unispora* CBS 398; (c) *K. servazzii* CBS 4311 und (d) *K. lodderae* CBS 2757 nach Kultivierung über 7 Tage bei +10 °C auf Glucose-Hefeextrakt-Pepton-Agar... 63
- Abbildung 21: (a) *K. psychrophila* DSM 26230 und (b) Isolat 2 nach 10 Tagen Inkubation auf Glucose-Hefeextrakt-Pepton-Agar bei +10 °C: elfenbeinfarbene Einzelkolonien mit glänzender, glatter Oberfläche und glattem Rand 68
- Abbildung 22: (a) Isolat 4 nach 10 Tagen Inkubation auf Glucose-Hefeextrakt-Pepton-Agar bei +10 °C: cremefarbene Einzelkolonien mit matt glänzender Oberfläche und geringgradig gelapptem Rand und (b) Isolat 4 nach 8 Wochen Inkubation; große, cremefarbene Einzelkolonien mit zentraler Erhebung und deutlich gelapptem Rand 68
- Abbildung 23: (a) *K. psychrophila* DSM 26230 und (b) Isolat 20 nach 10 Tagen Inkubation auf Hefeextrakt-Glucose-Chloramphenicol-Agar bei +10 °C: elfenbeinfarbene Einzelkolonien mit glattem Rand und glatter, glänzender Oberfläche..... 70
- Abbildung 24: (a) *K. psychrophila* DSM 26230 und (b) Isolat 14 nach 14 Tagen aerober Inkubation auf Sabouraud-Agar bei +10 °C: spiegeleiähnliche Einzelkolonien mit glänzender Oberfläche und glattem Rand 72
- Abbildung 25: Isolat 4 und Isolat 17 nach 14 Tagen aerober Inkubation auf Sabouraud-Agar bei +10 °C: (a) Isolat 4 mit elfenbeinfarbenen kugelförmigen Einzelkolonien; (b) Isolat 17 mit spiegeleiähnlichen Einzelkolonien und glattem Rand..... 72

- Abbildung 26: (a) Isolat 4 und (b) Isolat 17 nach 8 Wochen aerober Inkubation auf Sabouraud-Agar bei +10 °C: spiegeleiähnliche Kolonien mit gelappten Rändern bei beiden Isolaten..... 73
- Abbildung 27: (a) Lichtmikroskopische Darstellung von *K. psychrophila* DSM 26230 nach 7 Tagen auf Malz-Extrakt-Agar⁺ bei +10 °C (Nativpräparat, 100fache Vergrößerung); (b) Ascus mit 3 Ascosporen nach 14 Tagen Kultivierung auf Malz-Extrakt-Agar⁺ bei +10 °C (Nativpräparat, Zoom-Ansicht in 100facher Vergrößerung); (c) birnenförmige Zellen auf Sabouraud-Agar nach 10 Tagen bei +10 °C (schwarze Pfeile) (Nativpräparat, Zoom-Ansicht in 100facher Vergrößerung)..... 74
- Abbildung 28: Lichtmikroskopische Gegenüberstellung der *Kazachstania*-Referenzstämme nach aerober Anzucht auf Hefeextrakt-Glucose-Chloramphenicol-Agar bei +10 °C für 7 Tage: (a) *K. psychrophila* DSM 26230; (b) *K. lodderae* CBS 2757; (c) *K. unispora* CBS 398; (d) *K. servazii* CBS 4311 (b: Zoom-Ansicht in 100facher Vergrößerung; a, c+d: 100fache Vergrößerung)..... 75
- Abbildung 29: (a) Schwarze Pfeile: multiple Ascosporulation in mehreren Hefezellen (Isolat 6) auf Schafblutagar (b) anamorphe Stadien (unipolare Knospung) der überwiegend zitronenförmigen Hefezellen (Isolat 6) auf Sabouraud-Agar nach 7 Tagen Inkubation bei +10 °C (Nativpräparat, 100fache Vergrößerung)..... 76
- Abbildung 30: (a) Vereinzelte hufeisenförmige Zellen des Isolats 4 (schwarze Pfeile, Nativpräparat, 100fache Vergrößerung); (b) elongierte Zellform von Isolat 4 auf Malz-Extrakt-Agar⁺ nach 7 Tagen Inkubation bei +10 °C (Nativpräparat, Zoom-Ansicht in 100facher Vergrößerung)..... 77
- Abbildung 31: (a) Pseudohyphenbildung bei Isolat 5 und (b) Isolat 9 auf Malz-Extrakt-Agar⁺ nach Inkubation bei +10 °C über 7 Tage (Nativpräparat, Zoom-Ansicht in 100facher Vergrößerung)..... 77
- Abbildung 32: (a) Unipolare Knospung bei Isolat 17 nach 8 Tagen Kultivierung auf Malz-Extrakt-Agar⁺ bei +10 °C (Gram-Präparat, 40fache Vergrößerung); (b) Isolat 16: rund-ovale Hefezellen mit Gram-negativer Polnarbe (schwarzer Pfeil) (Gram-Präparat, 100fache Vergrößerung)..... 78
- Abbildung 33: (a) und (b) Deutliche Pseudohyphenbildung bei Isolat 7 nach 8 Tagen bei +10 °C auf Malz-Extrakt-Agar⁺ (MEA⁺) (a) Gram-Präparat, 40fache Vergrößerung; (b) Gram-Präparat, Zomausschnitt aus 100facher Vergrößerung 78
- Abbildung 34: Reaktionen und davon abgeleitete Gruppeneinteilung in die Gruppen A-G mit entsprechender Isolatnummerierung. Rot = negativ; Gelb = schwach/langsam positiv; Grün: positiv. Auswertung erstellt mit Bionumerics 7.5™ (AppliedMath, Pearson correlation; Methode: UPGMA)..... 82
- Abbildung 35: Einteilung der Isolate nach ihrem biochemischen Verhalten in die Gruppen A-G. Das Dendrogramm gibt Aufschluss über die Ähnlichkeit aller Gruppen in % im Vergleich zu Gruppe A. Gruppe D (Isolate 7; 8; 9) besitzt 97,5 % Ähnlichkeit zu Gruppe A; Gruppe C (Isolate 6; 19) zu 94,8 % Übereinstimmung, Gruppe E (Isolate 12; 13) unterscheidet sich mit 3 % von Gruppe A, Gruppe B (Isolat 5) zu 19 %, die Gruppen F (Isolat 20) und G (Isolat 18) zu 13,2 %; Auswertung erstellt mit Bionumerics 7.5™ (AppliedMath, Pearson correlation; Methode UPGMA)..... 83

- Abbildung 36: Gelelektrophoretische Auftrennung und Anfärbung mit Ethidium-Bromid (1 %ig) der 650 bp-langen Genabschnitte der D1/D2-Domäne; bp: Basenpaare; HL IV: HyperLadder IV (Bioline); neg: Negativkontrolle und Isolatnummern.. 84
- Abbildung 37: Pseudogeldarstellung der Massenspektren von *C. albicans* ATCC 10231 durch ClinProTools™ 3.0 (Bruker Daltoniks) gemessen nach der Anzucht auf unterschiedlichen Nährmedien (Columbia-Schafblut-Agar (CBA), Glucose-Hefeextrakt-Pepton (GYE)-Agar, Sabouraud (SAB)-Agar, Hefeextrakt-Glucose-Chloramphenicol (YGC)-Agar und Malz-Extrakt-Agar plus Novobiocin (MEA⁺) über 24 h bei +25 °C; rote Markierungen: Massenbereich hoher Intensitäten 88
- Abbildung 38: Gegenüberstellung der generierten Massenspektren von *K. psychrophila* DSM 26230 nach 72 h Inkubation bei +10 °C auf verschiedenen Nährmedien (Columbia-Schafblut-Agar (CBA), Glucose-Hefeextrakt-Pepton (GYE)-Agar, Sabouraud (SAB)-Agar, Hefeextrakt-Glucose-Chloramphenicol (YGC)-Agar und Malz-Extrakt-Agar plus Novobiocin (MEA⁺); Pfeil: zusätzliche Masse bei 2174 Da; Stern: hohe Intensität bei 3340 Da; Software FlexAnalysis 3.4™ (Bruker Daltoniks); baseline subtracted, geglättet; m/z: Masse-zu-Ladung-Verhältnis 89
- Abbildung 39: Pseudogeldarstellung der Massenspektren von *K. psychrophila* DSM 26230 durch ClinProTools 3.0™ (Bruker Daltoniks) gemessen nach der Anzucht auf unterschiedlichen Nährmedien (Columbia-Schafblut-Agar (CBA), Glucose-Hefeextrakt-Pepton (GYE)-Agar, Sabouraud (SAB)-Agar, Hefeextrakt-Glucose-Chloramphenicol (YGC)-Agar und Malz-Extrakt-Agar mit Novobiocin (MEA⁺) über 72 h bei +10 °C; m/z: Masse-zu-Ladungsverhältnis; rote Markierung: zusätzliche Masse bei 2174 Da; orange Markierung: hohe Intensität der Masse bei 3340 Da 90
- Abbildung 40: (a) Massenspektrum für *K. lodderae* CBS 2757; Kultivierung über 48 h bei +25 °C auf Sabouraud (SAB)-Agar gemäß den Vorgaben der CBS (Utrecht); Extraktionsprotokoll mit Ethanol (100 %) und Ameisensäure (FA, 70 %) mit Einwirkzeit (EWZ) über 5 min; (b) Zoomansicht des Massenbereichs 5800 bis 6800 Da aus (a); baseline subtracted, geglättet; FlexAnalysis 3.4™ (Bruker Daltoniks) 93
- Abbildung 41: Zoomansicht des Massenspektrums für *K. lodderae* CBS 2757 des Massenbereichs von 6000 bis 6 300 Da; Kultivierung über 48 Stunden bei +25 °C auf Sabouraud (SAB)-Agar, Proteinextraktion mit Ethanol (100 %) und Ameisensäure (FA, 70 %); Einwirkzeit (EWZ) Ameisensäure (FA) 12 min; baseline subtracted, geglättet; FlexAnalysis 3.4™ (Bruker Daltoniks) 95
- Abbildung 42: (a) Massenspektrum für *K. lodderae* CBS 2757; Kultivierung über 12 Stunden bei +25 °C auf Sabouraud (SAB)-Agar, Proteinextraktion mit Ethanol (100 %) und Ameisensäure (70 %); Einwirkzeit (EWZ) Ameisensäure (70 %) 10 Minuten; (b) Zoom-Ausschnitt von (a) im Massenbereich 6000 – 6200 Da; baseline subtracted, geglättet; FlexAnalysis 3.4™ (Bruker Daltoniks); m/z: Masse-zu-Ladung-Verhältnis 97

- Abbildung 43: (a) Massenspektren für *K. lodderae* CBS 2757; Kultivierung über 18 Stunden bei +25 °C auf Sabouraud (SAB)-Agar, Proteinextraktion mit Ethanol (100 %) und Ameisensäure (70 %); Einwirkzeit (EWZ) Ameisensäure 10 min; (b) Zoom-Ausschnitt von (a) im Massenbereich von 6 – 7,2 kDa; baseline subtracted, geglättet; FlexAnalysis 3.4TM (Bruker Daltoniks); m/z: Masse-zu-Ladungs-Verhältnis 98
- Abbildung 44: (a) Massenspektren für *K. lodderae* CBS 2757; Kultivierung über 18 Stunden bei +25 °C auf Sabouraud (SAB)-Agar, Proteinextraktion mit Ethanol (100 %) und Ameisensäure (70 %); Einwirkzeit (EWZ) Ameisensäure (70 %) 5 min; (b) Zoom-Ausschnitt von (a) im Massenbereich von 6 – 7,2 kDa; baseline subtracted, geglättet; FlexAnalysis 3.4TM (Bruker Daltoniks); m/z: Masse-zu-Ladungs-Verhältnis 99
- Abbildung 45: (a) Massenspektrum für *K. lodderae* CBS 2757; Kultivierung über 48 Stunden bei +10 °C auf Sabouraud (SAB)-Agar, Proteinextraktion mit Ethanol (100 %) und Ameisensäure (70 %); Einwirkzeit (EWZ) für Ameisensäure (FA) (70 %) 5 min; (b): Zoom-Ausschnitt von (a); baseline subtracted, geglättet; FlexAnalysis 3.4TM (Bruker Daltoniks); m/z: Masse-zu-Ladungs-Verhältnis 101
- Abbildung 46: Massenspektrum für *K. psychrophila* DSM 26230 nach aerober Inkubation über 72 Stunden bei +10 °C auf Sabouraud-Agar; baseline subtracted, geglättet; Software FlexAnalysis 3.4TM (Bruker Daltoniks); m/z: Masse-zu-Ladungs-Verhältnis 104
- Abbildung 47: Referenzspektrum (unten) aus der Summe von 26 Einzelspektren (oben) von *K. psychrophila* DSM 26230 mit Hilfe der Software Biotyper 3.1.66 OCTM (Bruker Daltoniks). blau: Referenzmasse; grün: exakte Übereinstimmung; gelb: Abweichung der relativen Intensität; rot: keine Übereinstimmung; m/z: Masse-zu-Ladungs-Verhältnis 104
- Abbildung 48: Massenspektrum für *K. psychrophila* DSM 26230 auf Basis der verkürzten Proteinextraktion (YOTL, oben) und der Proteinextraktion mit Ethanol (100 %) und Ameisensäure (70 %) (unten); rot markierte Bereiche: höhere Intensität im niedrigen Massenbereich bei der verkürzten Proteinextraktionsmethode, im höheren Massenbereich hingegen stärkere Intensitäten bei der unverkürzten Proteinextraktion; baseline subtracted, geglättet, Software FlexAnalysis 3.1TM (Bruker Daltoniks) 108
- Abbildung 49: MSP-Dendrogramm für die in der Datenbank Biotyper 3.1.66 OCTM (Bruker Daltoniks) enthaltenen *Kazachstania* spp.; *: selbst erstellte Referenzspektren; *Escherichia coli* DSM 682 als außenstehende Spezies 111
- Abbildung 50: Vergleichende Darstellung der Massen der *Kazachstania* (K.)-Referenzstämme; gelbe Markierung: unterschiedliche Massen von *K. psychrophila* DSM 26230 und *K. lodderae* CBS 2757; Software ClinProTools 3.0TM (Bruker Daltoniks); DSM: Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen; CBS: Centraalbureau voor Schimmelcultures; m/z: Masse-zu-Ladungs-Verhältnis 114
- Abbildung 51: Summenspektrum für *M. frigida* DSM 4634 (blau) generiert aus insgesamt 20 Einzelspektren (bunt); grün: exakte Übereinstimmung zur Referenzmasse; gelb: Abweichung in relativer Intensität; rot: keine Übereinstimmung; Software Biotyper 3.1.66 OCTM (Bruker Daltoniks); m/z: Masse-zu-Ladungs-Verhältnis 117

- Abbildung 52: Summenspektrum für *M. gelida* DSM 70882 (blau) aus insgesamt 20 Einzelspektren (bunt); grün: exakte Übereinstimmung zur Referenzmasse; gelb: Abweichung in relativer Intensität; rot: keine Übereinstimmung; Software Biotyper 3.1.66 OC™ (Bruker Daltoniks); m/z: Masse-zu-Ladung-Verhältnis. 117
- Abbildung 53: MSP-Dendrogramm für die Summenspektren von *M. gelida* DSM 70882, *M. frigida* DSM 4634, *K. psychrophila* DSM 26230 und den psychrophilen Wildstämmen; Software Biotyper 3.1.66 OC™ (Bruker Daltoniks) 118
- Abbildung 54: MSP-Dendrogramm für die Summenspektren von *K. psychrophila* DSM 26230 und den Hefe-Isolaten aus frischen und verdorbenen (*) Fleischproben; Software Biotyper 3.1.66 OC™ (Bruker Daltoniks) 120
- Abbildung 55: Massenvergleich aller *Kazachstania* (*K.*) *psychrophila*-Isolate aus frischem vakuumverpacktem Fleisch (rote Markierung: niedrigere Intensitäten) mit den Isolaten aus verdorbenem vakuumverpacktem Fleisch und dem Referenzstamm; Software ClinProTools 3.0™ (Bruker Daltoniks); m/z: Masse-zu-Ladung-Verhältnis; DSM: Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen 121

11 ANHANG

11.1 Herkunft der Wildstämme

Tabelle 38: Herkunft der Wildstämme mit Information über Tierart, Verpackungsart und Ursprungsland

Nummer	Isolat	Tierart	Material	Verpackungsart	Herkunftsland	Verderb
1	2014/12-99.1	Rind	Filet	Vakuumbbeutel	Deutschland	ja
2	2014/02-04.2	Rind	Kugel	Schrumpffolie	Deutschland	ja
3	2014/02-04.3.2	Rind	Kugel	Schrumpffolie	Deutschland	ja
4	2014/02-3.1	Rind	flache Schulter	Schrumpffolie, defekt	Deutschland	ja
5	2014/02-03.2	Rind	flache Schulter	Schrumpffolie, defekt	Deutschland	ja
6	2014/02-04.3.1	Rind	Kugel	Schrumpffolie	Deutschland	ja
7	2013/182-1212.9.1	Rind	Filet mit Kette	Schrumpffolie, defekt	Deutschland	ja
8	2014/02-05.2.1	Rind	dicke Schulter	Schrumpffolie	Deutschland	ja
9	2013/182-1212.8.1	Rind	Filet mit Kette	Schrumpffolie, defekt	Deutschland	ja
10	2013/182-1212.8.2	Rind	dicke Schulter	Schrumpffolie, defekt	Deutschland	ja
11	2014/02-05.3.1	Rind	dicke Schulter	Schrumpffolie	Deutschland	ja
12	2014/02-05.3.2	Rind	dicke Schulter	Schrumpffolie	Deutschland	ja
13	2014/02-05.2.2	Rind	Kugel	Schrumpffolie	Deutschland	ja
14	RD-AUS.8.2.2	Rind	nicht bekannt	Vakuumbbeutel	Australien	nein
15	RD-AUS.9.2.2	Rind	nicht bekannt	Vakuumbbeutel	Australien	nein
16	RD-AR.2.1.6	Rind	nicht bekannt	Vakuumbbeutel	Argentinien	nein
17	RD-AR.5.1.4	Rind	nicht bekannt	Vakuumbbeutel	Argentinien	nein
18	RD-AUS.10.1.2	Rind	nicht bekannt	Vakuumbbeutel	Australien	nein
19	LA-DE.5.10.3	Lamm	nicht bekannt	Vakuumbbeutel	Deutschland	nein
20	RD-DE.9.1.3	Rind	nicht bekannt	Vakuumbbeutel	Deutschland	nein

11.2. Materialien

11.2.1. Kulturelle Verfahren

Brutraum 25 °C

Bunsenbrenner Gasprofi 1 SCS [WLD-Tec, 05.131.74]

Columbia-Schafblut-Agar (CBA) [Oxoid, PB5039A]

Glucose-Hefeextrakt-Pepton-Agar (GYP-Agar), eigene Herstellung:

5 g Hefeextrakt granuliert [Merck, 1.03753.0500]

20 g Glucose [Merck, 1.08 337.1000]

10 g Pepton [Merck, 1.0743.1000]

20 g Agar [Oxoid, LP0013]

ad 1000 ml Aqua destillata

Autoklavieren bei 121 °C, 15 min

Impfschlingen, 10 µl steril [Süsse Labortechnik, 10719T]

Impfösen, 10 µl aus Platindraht

Kühlschrank Profiline 230 653, 10 °C [Riebler, 75.737.611.3]

Kühlschrank Profiline FKS 5000, 4 °C [Liebherr, 82.263.404.9]

Kühl- und Gefrierkombi mediline LCr 4010 [Liebherr, 82.262.024.0]

Malz-Extrakt-Agar (MEA), eigene Herstellung:

48 g Malz-Extrakt-Agar Fertigmischung [VWR, 1.05398.0500]

ad 1000 ml Aqua destillata

Autoklavieren bei 121 °C, 15 min

ad 0,125 g Novobiocin [AppliChem, A1944.0010]

Sabouraud-Agar (SAB-Agar), 4 %, eigene Herstellung:

28,5 g Sabouraud-Agar-Fertiggranulat [VWR, 1.05438.0500]

ad 1000 ml Aqua destillata

Autoklavieren bei 121 °C, 15 min

Untersuchungshandschuhe, puderfrei, Nitrile light [VWR, 112.2755]

Yeast-Glucose-Chloramphenicol-Agar (YGC-Agar), eigener Herstellung:

33 g Hefeextrakt-Glukose-Fertiggranulat [VWR, 1.16000.0500]

ad 1000 ml Aqua destillata

Autoklavieren bei 121 °C, 15 min

ad 0,1 g Chloramphenicol (20 µg/ml) [VWR, 0230-EU-100G]

11.2.2. Lichtmikroskopie

Deckgläser, 18 x 18 mm [VWR, 631.1567]

Ethanol 99,9 %

Immersionsöl [VWR, 630.1808]

Lichtmikroskop Leica CTR 5000 [Leica Mikrosysteme Vertriebs-GmbH, Wetzlar]

Light-Duty Tissue Wipers, 11 x 21 cm [VWR, 115.0202]

Natriumchlorid-Lösung 0,9 % [Roth, 3957.2]

Objektträger, geschnitten, mit Mattrand [VWR, 631.1551]

Grams Kristallviolettlösung [Merck, 1.09218.0500]

Lugols Lösung [Merck, 1.00567.1000]

Grams Safraninlösung [Merck, 1.09217.0500]

Zeitmessgerät [VWR, 620.0128]

11.2.3. Biochemische Charakterisierung

Adonitoltest [Liofilchem, 88208, LOT 100.114.041]

API 20 C AUX [BioMerieux, 20210]

API Candida [BioMerieux, 10500]

Arabinosetest [Liofilchem, 88209, LOT 09.011.402.2]

Arabitolttest [Liofilchem, 88207, LOT 01.081.509.3]

Dulcitoltest [Liofilchem, 88210, LOT 09.101.405.0]

Edelstahlpinzette

Galactosetest [Liofilchem, 88201, LOT 09.091.401.3]

Glucosetest [Liofilchem, 88202, LOT 12.011.140.67]

Inulintest [Liofilchem, 88212, LOT 12.231.404.6]

Inositoltest [Liofilchem, 88211, LOT 07.041.402.7]

Lactosetest [Liofilchem, 88203, LOT 06.201.402.6]
Levulosestest [Liofilchem, 88213, LOT 01.091.505.1]
Maltosetest [Liofilchem, 88204, LOT 06.031.408.0]
Mannitoltest [Liofilchem, 88214, LOT 09.111.405.3]
Mannosetest [Liofilchem, 88215, LOT 09.111.405.1]
Raffinosetest [Liofilchem, 88205, LOT 06.171.403.0]
Rhamnosetest [Liofilchem, 88216, LOT 07.251.406.9]
Salicintest [Liofilchem, 88217, LOT 09.011.402.4]
Sorbitoltest [Liofilchem, 88218, LOT 11.141.405.2]
Sucrosetest [Liofilchem, 88206, LOT 11.171.402.7]
Trehalosestest [Liofilchem, 88219, LOT 10.161.405.9]
Xylosestest [Liofilchem, 88220, LOT 11.261.420.4]

11.2.4. Molekularbiologische Untersuchung

Aqua bidestillata

AmpliTa[®] Gold DNA Polymerase [Applied Biosystems, 431 180 6]

Biocap DNA Box [Erlab, DNA 127 405]

BioPhotometer [Eppendorf, 613 122 555]

Centrifuge 5424 [Eppendorf, Gerätenummer 000 296 7]

Certified Molecular Biology Agarose [Biorad, BR 451 200 33]

DNeasy Blood & Tissue Kit[®] [Qiagen, 695 04]

DNA Loading Buffer, blue [Bioline, BIO 370 45]

dNTP Mix, 2 mM each [Fermentas, 100 242 000 953 720 714 58]

Ethidiumbromid-Lösung, 1% [Biorad, 161 043 3]

Geldokumentationssystem [Biorad, Typbezeichnung: Gel Doc 1000; Seriennummer: 1273]

Gelelektrophoresekammer Power Supply [Biorad, Typbezeichnung: 3000Xi, Seriennummer: 041 BR 177 04]

Hyper Ladder[™] 100 bp [Bioline, BIO 330 56]

I-Cycler [Biorad, Seriennummer: 582 BR 013 489]

Magnesium-Chlorid (MgCl₂) [Applied Biosystems, L000 26-01]

Mikrowelle Typ MM 646 0 [Micromaxx, Seriennummer D407 245 126 02]

MiniSpin plus Centrifuge 5453 [Eppendorf, Gerätenummer 002 5-736]

PCR Gold Buffer [Applied Biosystems, L000 26-01]

Pipette Research 3110, 0,5-10 µl [Eppendorf, Seriennummer: 305 236 3]

Pipette Research 3111, 10-100 µl [Eppendorf, Seriennummer: 300 215 3]

Pipette Research 3111, 20-200 µl [Eppendorf, Seriennummer: 303 599 3]

Pipette Research 3110, 100-1000 µl [Eppendorf, Seriennummer: 311 392 3]

Pipettenspitzen PCR clean, ep.T.I.P.S Reloads 0,1-20 µl [Eppendorf, Bestellnummer: 0030 073.762]

Pipettenspitzen PCR clean, ep.T.I.P.S Reloads 2-200 µl [Eppendorf, Bestellnummer: 0030 073.762]

Pipettenspitzen PCR clean, ep.T.I.P.S Reloads 50-1000 µl [Eppendorf, Bestellnummer: 0030 073.843]

Primer ITS1 (Sequenz 5` TCCGTAGGTGAACCTGCGG 3`) [Eurofins MWG Operon, Barcode: 017 656 763]

Primer ITS4 (Sequenz 5` TCCTCCGCTTATTGATATGC 3`) [Eurofins MWG Operon, Barcode: 017 656 764]

Primer NL1 (Sequenz 5` GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG 3`) [Eurofins MWG Operon, Barcode: 017 656 761]

Primer NL4 (Sequenz 5` GGTCCGTGTGTTTCAAGACGG 3`) [Eurofins MWG Operon, Barcode: 017 656 762]

Präzisionswaage [Sartorius, Typbezeichnung: CP 320 2SOCE, Seriennummer: 164 073 81]

Quali-PCR-Tube-Streifen, Low Profile [Kisker, G003 LPSF]

QiaQuick PCR Purification Kit [Qiagen, Artikelnummer: 28 106]

Rotiphorese 10 x TBE-Puffer [Roth, Artikelnummer: 306 12]

ThermoMixer C [Eppendorf, Seriennummer 5 382 DH 003 701]

Tissue Lyser [Qiagen, Katalognummer: 852 20, Seriennummer: 125 040 144]

UVette® 220-1600 nm [Eppendorf, Bestellnummer: 003 0106.300]

Wasser für molekularbiologische Zwecke [AppliChem, A7398-0500]

Werkbank UVT-S-AR [LTF Labortechnik, Seriennummer: 040 107-1208-0123]

11.2.5. Massenspektrometrie

Ameisensäure 70 % [Geyer, Seriennummer: 2694]

Autoflex Speed [Bruker, Seriennummer: 264 420 003 08]

Aqua destillata, steril

Bacterial Test Standard *Escherichia coli* [Bruker, 8255343]

Ethanol (absolut (100 %)) [Merck, 1.00983.1011]

Maldi MTP target frame III [Bruker, 80 74 115]

Maldi MTP 384 target plate ground steel [Bruker, 82 80 784]

Maldi MTP 384 target plate polished steel [Bruker, 82 80 761]

CHCA-Matrix, eigene Herstellung:

Organic solvent:

25 µl Trifluoressigsäure

500 µl Acetonitril [Chemsolute, 2637]

ad 475 µl Aqua destillata (HPLC-grade)

14 mg α -Cyano-4-Hydroxy cinnamic acid (=Zimtsäure) [Bruker, 201 344]

ad 970 µl Organic solvent

Holzapplikationsstäbchen [dm Drogeriemarkt]

Minizentrifuge ScanSpeed mini [LaboGene, 760 131 410 1]

Reagiergefäße 1,5 ml [Sarstedt, 72 706 400]

Vortexer lab dancer [IKA, 06.111040]

Werkbank HS 12 [Heraeus, 400 905 83]

Tabelle 39: Massenliste von *K. lodderae* CBS 2757, *K. psychrophila* DSM 26230, *M. gelida* DSM 70882 und *M. frigida* DSM 4634

<i>K. lodderae</i> CBS 2757		<i>K. psychrophila</i> DSM 26230		<i>M. gelida</i> DSM 70882		<i>M. frigida</i> DSM 4634	
Masse [Da]	Intensität [%]	Masse [Da]	Intensität [%]	Masse [Da]	Intensität [%]	Masse [Da]	Intensität [%]
3074	38,8	3074	42,1	3095	58,4	3085	4,4
3092	4,0	3094	12,3	3142	4,9	3095	5,1
3114	2,09	3100	11,6	3189	9,8	3111	3,8
3162	2,24	3212	8,1	3202	26,3	3132	4,1
3210	2,97	3261	4,8	3287	17,9	3159	4,0
3297	16,6	3277	15,3	3334	3,4	3204	5,7
3315	2,5	3293	7,2	3351	4,7	3214	4,5
3338	5,6	3330	5,3	3379	5,3	3226	4,0
3425	2,4	3372	8,2	3401	4,8	3277	25,0
3447	18,0	3414	6,7	3443	36,6	3289	11,3
3466	3,4	3482	33,4	3481	4,1	3301	5,4
3487	33,6	3494	23,1	3496	4,5	3363	21,6
3504	5,2	3514	6,5	3546	4,9	3403	4,8
3521	2,78	3531	7,0	3571	82,6	3428	4,6
3559	2,9	3680	11,7	3587	10,0	3443	4,1
3604	1,74	3812	16,5	3608	3,7	3456	3,0
3633	2,34	3846	5,6	3659	8,8	3468	3,7
3652	2,28	3890	7,4	3679	5,1	3542	3,3
3673	1,56	4135	10,7	3785	4,2	3574	5,1
3809	3,35	4246	5,5	3835	3,1	3669	5,5
3958	3,6	4280	9,9	3858	8,9	3728	6,8
3990	2,04	4370	8,5	3890	3,0	3742	8,5
4015	2,02	4389	44,3	3931	3,1	3743	8,0

K.: *Kazachstania*; M.: *Mrakia*; CBS: Centraalbureau voor Schimmelcultures; Da: Dalton; DSM: Deutsche Stammsammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen

Fortsetzung Tabelle 39: Massenliste von *K. lodderae* CBS 2757, *K. psychrophila* DSM 26230, *M. gelida* DSM 70882 und *M. frigida* DSM 4634

<i>K. lodderae</i> CBS 2757		<i>K. psychrophila</i> DSM 26230		<i>M. gelida</i> DSM 70882		<i>M. frigida</i> DSM 4634	
Masse [Da]	Intensität [%]	Masse [Da]	Intensität [%]	Masse [Da]	Intensität [%]	Masse [Da]	Intensität [%]
4083	1,8	4495	5,6	3950	13,1	3801	26,6
4363	2,21	4551	5,5	3980	3,2	3816	16,0
4382	21,2	4627	12,0	4056	4,8	3876	5,7
4398	4,91	4635	8,2	4074	2,9	3905	3,9
4423	1,9	4708	8,3	4162	2,9	3951	17,9
4453	2,2	4778	7,6	4185	4,2	3974	5,1
4581	4,96	4889	9,1	4212	13,4	4004	4,5
4616	1,8	4936	5,5	4272	28,2	4093	4,4
4644	5,0	5114	9,1	4434	50,2	4192	4,4
4692	3,73	5333	8,1	4450	11,2	4250	7,3
4799	2,1	5498	7,4	4474	3,0	4270	11,4
4823	5,7	5520	26,4	4587	3,3	4291	7,6
4893	3,0	5654	6,0	4787	26,4	4357	14,8
4950	3,1	5878	8,7	4811	11,3	4370	7,5
5014	1,8	5897	5,2	4857	4,1	4435	4,0
5108	2,5	5976	8,6	4882	5,2	4697	3,5
5247	4,2	6013	7,2	4931	63,0	4741	3,2
5268	1,4	6033	6,3	5329	2,7	4801	3,8
5369	2,8	6111	10,3	5488	19,9	4820	9,5
5451	5,3	6151	92,6	5678	7,2	4837	2,9
5483	5,2	6166	45,1	5789	17,8	4881	5,5
5938	5,6	6184	22,6	5910	5,6	4897	9,3
5957	2,9	6533	7,1	5930	11,0	4917	100,0

K.: *Kazachstania*; M.: *Mrakia*; CBS: Centraalbureau voor Schimmelcultures; Da: Dalton; DSM: Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen

Fortsetzung Tabelle 39: Massenliste von *K. lodderae* CBS 2757, *K. psychrophila* DSM 26230, *M. gelida* DSM 70882 und *M. frigida* DSM 4634

<i>K. lodderae</i> CBS 2757		<i>K. psychrophila</i> DSM 26230		<i>M. gelida</i> DSM 70882		<i>M. frigida</i> DSM 4634	
Masse [Da]	Intensität [%]	Masse [Da]	Intensität [%]	Masse [Da]	Intensität [%]	Masse [Da]	Intensität [%]
5988	6,6	6555	17,8	5965	69,7	4931	30,5
6014	24,6	6586	5,0	5993	8,2	4951	10,5
6040	3,8	6752	11,0	6152	5,9	4989	4,6
6109	5,0	6774	5,5	6190	94,3	5045	3,0
6150	100,0	6793	7,1	6221	8,5	5111	3,4
6184	8,6	6829	16,2	6385	8,0	5196	3,2
6205	3,1	6902	12,1	6405	27,0	5311	3,1
6596	18,4	6962	94,8	6581	3,6	5502	3,6
6628	2,5	6974	56,8	6699	3,3	5555	3,6
6654	2,4	6998	21,4	7104	3,3	5653	3,1
6680	2,7	7061	21,0	7142	97,8	5681	3,4
6842	3,4	7076	11,6	7177	5,8	5798	3,1
6896	37,0	7096	7,1	7285	4,5	6008	5,5
6932	13,19	7201	4,7	7323	7,2	6190	3,2
6976	77,9	7336	8,0	7340	4,1	6578	4,1
7008	9,4	7621	10,2	7901	3,5	7460	2,8
7039	9,3	7638	11,0	8425	7,0	7486	3,3
7119	3,2	7671	12,2	8542	6,1	7598	15,2
7342	3,4	7776	5,6	8868	19,1	7626	6,0
7664	1,87	8556	7,0	9572	7,1	7902	3,2
7872	3,8	8741	6,2	9621	4,7	8712	3,4
8764	13,2	8778	35,1	9860	25,6	9833	26,2
8798	1,73	8812	6,3	10974	3,5	9866	3,8

K.: *Kazachstanica*; M.: *Mrakia*; CBS: Centraalbureau voor Schimmelcultures; Da: Dalton; DSM: Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen

12. DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt Herrn Univ.-Prof. Dr. Dr. habil. M. Gareis, Inhaber des Lehrstuhls für Lebensmittelsicherheit des Veterinärwissenschaftlichen Departments der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München, für die Überlassung des Themas, das Interesse an der Arbeit sowie die hervorragenden Arbeitsbedingungen.

Im Besonderen möchte ich mich bei Frau Dr. med. vet. R. Bonke für die hervorragende Betreuung, die gute Zusammenarbeit und die konstruktiven Ratschläge während der Durchführung der Arbeit, sowie die große Mühe bei der Korrektur der Entwürfe bedanken.

Weiterhin möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des Lehrstuhls für Lebensmittelsicherheit für die gute Einarbeitung und Zusammenarbeit bedanken, sowie für die stetige Offenheit für Fragen. Mein besonderer Dank gilt dabei Herrn Dr. rer. nat. C. Gottschalk, Herrn Dr. med. vet. S. Ulrich, sowie dem Team der Bioanalytik für die geduldige Einarbeitung im Bereich der Massenspektrometrie.

Zudem möchte ich mich herzlich bei Herrn Dr. med. O. Bader, Frau Dr. med. M. Bernhard, sowie allen Mitarbeitern des Institutes für Mikrobiologie der Universitätsmedizin Göttingen für eine sehr lehrreiche Zeit, deren unermüdliche Geduld und die herzliche Aufnahme in das Team während meines Aufenthaltes bedanken.

Abschließend bedanke ich mich bei meiner Familie und meinen Freunden, die mir stets ihre größtmögliche Unterstützung entgegenbrachten, ohne die die Anfertigung dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre.